



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
**MESTRADO**

CAROLINE BUSATTA VAZ DE PAULA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA  
ENDOMETRIOSE PERITONEAL EM UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM  
RATAS**

**CURITIBA  
2017**

CAROLINE BUSATTA VAZ DE PAULA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA  
ENDOMETRIOSE PERITONEAL EM UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM  
RATAS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientadora:** Professora Dra. Lúcia de Noronha

**Co-orientadora:** Professora Dra. Vivian Ferreira do Amaral

**CURITIBA  
2017**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central

Paula, Caroline Busatta Vaz de  
P324a Avaliação do efeito do plasma rico em plaquetas na endometriose peritoneal  
2017 em um estudo experimental em ratas / Caroline Busatta Vaz de Paula ;  
orientadora: Lucia de Noronha. – 2017.  
62 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,  
Curitiba, 2017  
Bibliografia: f. 55-61

1. Ciências da Saúde. 2. Endometriose - tratamento. 3. Roedor como  
animal de laboratório. 4. Experimentos clínicos. I. Noronha, Lucia de.  
II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação  
em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 20. ed. – 610



## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Sebastião e Carmem, meus  
exemplos de amor e respeito!*

*Ao Eduardo, meu porto seguro e  
companheiro!*

*À Mirelinha, meu pequeno anjo, luz da  
minha vida!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço com todo carinho:

À minha orientadora Professora Dra. Lúcia de Noronha, que assumiu minha orientação praticamente no fim do mestrado e que não mediu esforços em me ajudar. Obrigada por toda orientação, paciência e ensinamento.

Ao Professor Dr. Carlos Aita, por também assumir minha orientação durante o mestrado. Apesar do pouco tempo em que fui sua orientanda, lhe agradeço pelas conversas e pelo tempo que dedicou à elaboração deste trabalho.

À Professora Dra. Vivian Ferreira do Amaral pela oportunidade de cursar este mestrado.

Durante esse mestrado tive o prazer de conhecer três pessoas maravilhosas as quais posso chamar de amigos. Marina L. V. de Azevedo, muito obrigada por seu ombro amigo, por nossas longas conversas e por toda ajuda que deu em relação ao mestrado. Ana Paula C. Martins, nos dias em que tudo estava difícil, suas histórias cômicas me permitiam ficar mais leve e me davam forças a seguir em frente. Seigo Nagashima se existe uma pessoa que raramente me disse "não" foi você. Obrigada por nossas conversas e por todo o apoio. Sem você as imagens dessa dissertação não seriam as mesmas.

À Carolina Savari, por sua amizade singela e por se dispor a me ajudar nos procedimentos cirúrgicos.

Ao Ricardo Cunha, Júlio César Francisco, Misael Gomes Barbosa e João Felipe D. Westphalen por disponibilizarem de seu tempo para me ajudar em relação aos procedimentos cirúrgicos.

À Jane Fabia Domênica por todo auxílio que me deu em relação aos processos administrativos (sempre com um sorriso encantador).

Ao Eduardo, meu marido e companheiro. Obrigada por ler e reler esta dissertação, por me incentivar e motivar a fazer esse mestrado. Sem dúvidas você é a razão pela qual cheguei até aqui. Te amo para sempre!

Aos meus pais, Sebastião e Carmem, por seu amor incondicional, por sua fé, pelo colo que me deram tantas e tantas vezes ao longo desse mestrado. Vocês são o meu norte.

Ao Régis e a Soeli, pais que a vida também me presenteou. Obrigada por seu carinho, zelo e afeto.

À Célia e a Monica, obrigada por sua amizade verdadeira e por seu ombro amigo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, que de alguma forma, direta ou indiretamente colaboraram com este trabalho.

A Deus, sem Ti nada do que estou vivendo seria possível.

## EPÍGRAFE

"De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro."

(Fernando Sabino)

## RESUMO

A endometriose é uma condição clínica comum, de etiopatogenia controversa e que acomete principalmente mulheres em idade reprodutiva. A terapêutica medicamentosa clássica é fundamentada na supressão hormonal ovariana, de forma a induzir um ambiente hipoestrogênico que proporcione a atrofia dos focos endometrióticos. No entanto, a recorrência dos sintomas é comum após a interrupção do tratamento. A busca por novas formas terapêuticas efetivas se faz necessária para o melhor controle dos sintomas e complicações desta doença. O plasma rico em plaquetas (PRP) é definido como uma fração de plasma que possui uma concentração de plaquetas acima dos níveis fisiológicos, além de apresentar condições de liberar substâncias que parecem estar envolvidos na modulação inflamatória. O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do uso de PRP em um modelo experimental de endometriose peritoneal. Sessenta ratas foram submetidas à técnica de indução de endometriose. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos. O grupo C (n= 18) recebeu uma injeção intraperitoneal de 0,2ml de solução salina. O grupo L (n=13) recebeu uma injeção subcutânea de 1mg/kg de acetato de leuprolide. O grupo PRP (n= 17) recebeu uma injeção intralesional de 0,05ml de PRP. Sessenta dias após a primeira cirurgia os animais foram submetidos à eutanásia, para que se pudesse avaliar o tamanho dos implantes e realizar a análise histológica e imunoistoquímica de citocinas e células inflamatórias. Os resultados demonstraram que o PRP e o acetato de leuprolide promoveram uma redução significativa da área do implante em relação ao grupo controle ( $p= 0,007$  e  $p= 0,044$ ). Resultado semelhante foi observado em relação à interleucina 1 $\alpha$  (IL-1  $\alpha = p<0,001$ ); interleucina 6 (IL-6 =  $p<0,001$ ); fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha = p<0,001$ ); células Natural Killer (células CD56+ =  $p<0,001$ ) e células dendríticas (células CDF+ =  $p<0,007$ ). A análise histológica evidenciou que o único grupo que apresentou predomínio do escore 0 ou 1 foi o grupo L (n=8) com 61, 5%, a medida que os grupos C e PRP apresentaram apenas 11,1% e 11,8% respectivamente destes escores (0 ou 1). Conclui-se que a terapia com PRP reduziu a área de superfície dos implantes, mas não a expressão dos marcadores inflamatórios estudados, bem como não impediu o crescimento dos focos de endometrióticos.

## SUMMARY

Endometriosis is a common clinical condition of controversial etiopathogenesis and affects mainly women of reproductive age. Classical drug therapy is based on ovarian hormonal suppression, to induce a hypoestrogenic environment that provides endometriotic foci atrophy. However, recurrence of symptoms is common after discontinuation of treatment. The search for new effective therapeutic forms is necessary for better control of the symptoms and complications of this disease. Platelet-rich plasma (PRP) is defined as a fraction of plasma that has a platelet concentration above physiological levels, as well as being able to release substances that appear to be involved in inflammatory modulation. The present study aims to evaluate the effect of the use of PRP in an experimental model of peritoneal endometriosis. Sixty rats were submitted to the endometriosis induction technique. The animals were randomly assigned to three groups. Group C (n = 18) received an intraperitoneal injection of 0.2 ml of saline solution. The L group (n = 13) received a subcutaneous injection of 1 mg / kg of leuprolide acetate. The PRP group (n = 17) received an intralesional injection of 0.05 ml of PRP. Sixty days after the first surgery the animals were submitted to euthanasia, so that the size of the implants could be evaluated and histological and immunohistochemical analysis of cytokines and inflammatory cells. The results showed that PRP and leuprolide acetate promoted a significant reduction of the implant area in relation to the control group ( $p = 0.007$  and  $p = 0.044$ ). Similar result was observed in relation to interleukin 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$  =  $p < 0.001$ ); Interleukin 6 (IL-6 =  $p < 0.001$ ); tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$  =  $p < 0.001$ ); Natural Killer cells (CD56 + cells =  $p < 0.001$ ) and or dendritic cells (CDF+ cells =  $p < 0.007$ ). Histological analysis showed that the only group that presented a predominance of the 0 or 1 score was the L group (n = 8) with 61.5%, as groups C and PRP presented only 11.1% and 11.8% Respectively of these scores (0 or 1). It was concluded that PRP therapy reduced the surface area of the implants, but not the expression of the inflammatory markers studied, nor did it prevent the growth of the endometriotic foci.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BCL-2** - B cell lymphoma-2  
**NK** - Células Natural Killer  
**TH1** - T helper 1  
**TH2** - T helper 2  
**IFN- $\gamma$**  - Interferon gama  
**PRP** - Plasma rico em plaquetas  
**IL-1** - Interleucina 1  
**IL-1 $\alpha$**  - Interleucina 1 alfa  
**IL-1 $\beta$**  - Interleucina 1 beta  
**IL-4** - Interleucina 4  
**IL-6** - Interleucina 6  
**TNF- $\alpha$**  - Fator de Necrose Tumoral  
**FC** - Fator de crescimento  
**VEGF** - Fator de crescimento do Endotélio Vascular  
**HGF** - Fator de crescimento Hepático  
**TGF- $\beta$ 1** - Fator de crescimento Beta 1  
**IGF-1** - Fator de crescimento Insulina 1  
**IDGF** - Fator de crescimento Derivado de Plaquetas  
**PSGL-1** - Ligante 1 da Glicoproteína P-selectina  
**I $\kappa$ B** - Proteína Inibitória Kappa B  
**I $\kappa$ B $\alpha$**  - Proteína Inibitória Kappa B - Alfa  
**NF- $\kappa$ B** - Fator de Transcrição Nuclear Kappa B  
**GnRH** - Hormônio Liberador de Gonadotrofina  
**CD68** - Marcador de Monócitos  
**CD4** - Marcador de Linfócitos  
**CDF** - Marcador de Células Dendríticas  
**CD56** - Marcador de Células Natural Killer  
**MCP-1** - Proteína Quimiotática de Monócitos

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> A ilustração demonstra as células endometriais adentrando na cavidade peritoneal por meio da menstruação retrógrada. Em pacientes com endometriose estas células não são eliminadas corretamente pelo sistema imune local, acarretando no desenvolvimento de implantes endometriais. Adaptado de Hemmings e Falcone, 2015. <sup>28</sup> .....	19
<b>Figura 2.</b> Atividade anti-inflamatória do PRP. O NF-κB é ativado por meio de estímulos extracelulares, como por exemplo, as citocinas IL-1β e TNF-α. Uma vez ativado, o NF-κB é translocado para o interior do núcleo ligando-se à região promotora dos genes alvos, aumentando a transcrição de mediadores pró-inflamatórios. O PRP inibiria a cascata de ativação do NF-κB. <sup>50</sup> .....	23
<b>Figura 3.</b> Etapas dos procedimentos cirúrgicos desde indução cirúrgica da endometriose, diagnóstico e tratamento. ....	27
<b>Figura 4.</b> Exposição do corno uterino direito. Fonte: a autora, 2015.....	28
<b>Figura 5.</b> Implante endometrial suturado na cavidade peritoneal do lado esquerdo da rata. Fonte: a autora, 2015. ....	28
<b>Figura 6.</b> Comprovação macroscópica do desenvolvimento do implante. Fonte: a autora, 2015. ....	30
<b>Figura 7.</b> A) Centrífuga HT TDL 80-2B; B) Centrífuga HT TDL 80-2B. Fonte: a autora, 2015. ....	31
<b>Figura 8.</b> Tubo de ensaio após a primeira centrifugação. A fase superior contendo plasma e plaquetas, a intermediária composta pela zona névoa e a inferior representada por hemácias. Fonte: a autora, 2015.....	32
<b>Figura 9.</b> Detalhe do plasma obtido após a segunda centrifugação. Botão eritrocitário-plaquetário e PPP em cerca de dois terços da região superior do tubo. Fonte: a autora, 2015. ....	32
<b>Figura 10.</b> Visualização do número de plaquetas (462.000/mm <sup>3</sup> ) após a coleta de sangue da rata. ....	33
<b>Figura 11.</b> Visualização do enriquecimento do número de plaquetas (2.852.000/mm <sup>3</sup> ) após o procedimento de obtenção do PRP.....	33
<b>Figura 12.</b> Etapas do processo de obtenção do PRP. Fonte: a autora, 2015. ....	34

**Figura 13.** Avaliação histopatológica dos implantes endometrióticos. (A) Escore 0, (B) Escore 1, (C) Escore 2, (D) Escore 3. Aumento de 10x e 400x respectivamente. Fonte: a autora, 2016. ....35

**Figura 14.** Confecção do TMA. (A). Bloco doador, dos quais são retirados fragmentos da amostra. (B) Broca cilíndrica, utilizada para retirar os fragmentos e construir o bloco receptor. (C) Bloco receptor, contempla os microarranjos das amostras, possui linhas e colunas previamente identificadas por um mapa em plano cartesiano. (E) Lâmina do TMA concluída. Fonte: a autora, 2016. ....36

**Figura 15.** Lâmina de TMA digitalizada demonstrando os vários implantes de diversos animais em uma mesma lâmina. Observe que neste aumento panorâmico os implantes são em sua maioria císticos. Fonte: a autora, 2016. ....38

**Figura 16.** Análise morfométrica. (A) Imagem da lâmina imunocorada com o anticorpo anti-interleucina 6 (IL- 6) através da técnica de imunistoquímica. (B) Imagem otimizada com o auxílio do software Adobe Photoshop CS6 v 13.0®. (C) Imagem submetida à máscara para análise morfométrica onde a cor verde representa a ausência de tecido ou luz do cisto endometriótico, a cor amarela representa o tecido negativo para IL-6 e a cor vermelha demonstra as áreas que apresentam imunexpressão tecidual para IL-6. Fonte: a autora, 2016. ....39

**Figura 17.** Cisto endometriótico corado com anticorpo anti CD56 e dividido em quatro quadrantes. A leitura das células inflamatórias CD56+ no estroma do cisto, neste caso, foi realizada, selecionando-se campos apenas nos quadrantes inferiores. Os escores que representam o número de células positivas por campo variaram entre 1 e 3, conforme o exemplo demonstrado pelos círculos. Fonte: a autora, 2016. ....41

**Figura 18.** Análise histopatológica segundo a classificação de Keenan. O grupo leuprolide apresentou relevância estatística frente aos grupos controle e PRP por apresentar menor número de casos 2 ou 3. A primeira e a terceira imagem evidenciam o epitélio bem preservado (Keenan 3) dos grupos controle e PRP, respectivamente, enquanto a imagem central demonstra o epitélio mal preservado (Keenan 1) referente ao grupo leuprolide. Fonte: a autora, 2017. ....44

**Figura 19.** Análise estatística das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . Observe-se que houve significância estatística no grupo PRP versus controle das citocinas: IL-

1 $\alpha$ : p<0,001; IL-6: p<0,001; TNF $\alpha$ : p<0,001, bem como se observa significância estatística em todos os marcadores inflamatórios do grupo leuprolide versus o controle. As imagens dos cistos estão coradas em vermelho, demonstrando a imunopositividade tecidual em relação às citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  respectivamente. Estas imagens estão localizadas abaixo de seus respectivos grupos nos gráficos. Fonte: a autora, 2017. ....46

**Figura 20.** Análise estatística das células CD68+, CD56+, CD4+ e CDF+. Observa-se que houve significância estatística no grupo PRP versus o controle das células inflamatórias CD56: p<0,001 e CDF: p<0,007, em como se observa se observa significância estatística em todos as células inflamatórias do grupo leuprolide versus o controle. Os círculos vermelhos representam a leitura realizada em um campo do cisto endometriótico com contagem do número de células inflamatórias CD68+, CD56+, CD4+ e CDF+ respectivamente. As imagens estão localizadas abaixo de seus respectivos grupos no gráfico. Fonte: a autora, 2017. ....47

## TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Distribuição dos grupos conforme tratamento.....	29
<b>Tabela 2.</b> Interleucinas e condições empregadas nos testes imunoistoquímicos.....	37
<b>Tabela 3.</b> Marcadores e condições empregadas nos testes imunoistoquímicos.....	40
<b>Tabela 4.</b> Tamanho do implante endometriótico (mm <sup>2</sup> ) nos três momentos de procedimentos cirúrgicos.....	42
<b>Tabela 5.</b> Frequências e percentuais de animais de acordo com os grupos e as classificações de Keenan.....	43
<b>Tabela 6.</b> Estatística descritiva dos marcadores inflamatórios (citocinas e células inflamatórias) e valores de p obtidos quando os grupos são confrontados dois a dois (C= controle; L=leuprolide; P = PRP).....	45
<b>Tabela 7.</b> Correlação da área dos implantes no momento da eutanásia com os marcadores pró-inflamatórios do grupo referente ao PRP (p<0,05).....	48

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 O Conceito de Endometriose - Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Diagnósticos.....	15
1.2 Teorias Relevantes e a Etiopatogenia da Endometriose.....	16
1.3 O Sistema Imune e a Etiopatogenia da Endometriose.....	16
1.4 O Tratamento da Endometriose - Medicamentos Tradicionais e Novas Modalidades Experimentais.....	19
1.5 Os Modelos Animais de Endometriose.....	24
1.6 A Hipótese do Estudo.....	24
<b>2 OBJETIVO</b> .....	25
2.1 Objetivos Específicos.....	25
<b>3 MÉTODO</b> .....	26
3.1 Procedimentos Cirúrgicos.....	26
3.1.1 Primeira Cirurgia.....	27
3.1.2 Segunda Cirurgia.....	29
3.1.3 Terceira Cirurgia.....	30
3.2 Preparo do Plasma Rico em Plaquetas (PRP).....	30
3.3 Análise Histológica - Metodologia de Keenan.....	34
3.4 Análise Imunoistoquímica.....	35
3.4.1 Técnica de preparo do TMA.....	35
3.4.2 Realização dos ensaios imunoistoquímicos com Interleucinas pró-inflamatórias.....	37
3.4.3 Análise Morfométrica.....	37
3.4.4 Realização dos ensaios imunoistoquímicos com anticorpos primários anti CD4, CD56, CD68 e CDF.....	39
3.4.5 Avaliação quantitativa das células inflamatórias no estroma da lesão endometriótica.....	40
3.5 Análise Estatística.....	41

<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	42
4.1	RESULTADOS MORFOLÓGICOS E IMUNOISTOQUÍMICOS .....	42
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	54
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55
	<b>ANEXO A - PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA</b> .....	62

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O Conceito de Endometriose - Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Diagnósticos

Caracterizada pela presença de tecido endometrial funcional (glândula e estroma) fora da cavidade uterina<sup>1</sup>, a endometriose é uma desordem ginecológica comum que afeta cerca de 176 milhões de mulheres no mundo em idade reprodutiva, segundo Admson et al.<sup>2</sup> e aproximadamente 7 milhões de brasileiras, conforme o estudo proposto por D'Amico Filho et al.<sup>3</sup>. Em geral, as manifestações clínicas apresentadas nas portadoras de endometriose são dismenorreia, dispareunia, dor pélvica e infertilidade<sup>4</sup>. Contudo, 50% a 60% das mulheres apresentam dor pélvica e até 50% são inférteis, constatando que estas são as condições predominantemente encontradas nestas pacientes<sup>5</sup>. Deve-se salientar, também, que são encontradas pacientes oligo e assintomáticas (2 a 22% dos casos),<sup>4</sup> assim como pode se observar uma dissociação entre a intensidade dos sintomas e o estágio em que a doença se apresenta<sup>6</sup>. De acordo com a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva<sup>7</sup> a endometriose é classificada em quatro estádios, variando de mínimo (estadio I) à grave (estadio IV), sendo estes fundamentados no aspecto, localização, extensão e profundidade dos implantes e, na presença e tamanho de endometriomas. Tais parâmetros, em conjunto, refletem a dimensão da doença, bem como possibilitam uma padronização de registro dos dados patológicos. A suspeição e o diagnóstico clínico são considerados os pontos de partida para a identificação da doença, porém o padrão-ouro de diagnóstico da endometriose se dá mediante a visualização direta da lesão endometrial por videolaparoscopia, acompanhada de confirmação histológica<sup>8</sup>.

## **1.2 Teorias Relevantes e a Etiopatogenia da Endometriose**

Embora considerada uma doença do século XX, esta moléstia é reconhecida desde o século XVII. Von Rokitanski, em 1860, baseou-se em material de necropsia para descrever a afecção, sugerindo que a endometriose fosse uma doença comum que acometia mulheres em idade adulta<sup>9</sup>. São mais de cem anos de estudos científicos acerca dessa alteração ginecológica, porém sua origem e etiologia não foram elucidadas em sua totalidade resultando em uma difusão de teorias<sup>10</sup>. Duas correntes principais de hipóteses se destacam ao tentar explicar a etiopatogenia da endometriose. A primeira delas é denominada teoria da metaplasia celômica, segundo a qual ocorreria transformação de mesotélio, por metaplasia, em tecido endometrial<sup>11</sup>. Contudo, a aceitação desta teoria não é consensual devido à fragilidade de sustentação da mesma<sup>12</sup>. Sampson, em 1927, elaborou a hipótese etiológica mais aceita atualmente, a da menstruação retrógrada, explicando que ocorreria aderência de tecido endometrial pós-menstrual na cavidade peritoneal e demais órgãos, decorrente do refluxo tubário<sup>13</sup>. Entretanto, um dos aspectos discutidos em relação a esta hipótese é que praticamente 90% das mulheres apresentam fluxo retrógrado e apenas 10% delas possuem endometriose, sugerindo assim, que outros fatores poderiam determinar uma maior propensão para o desenvolvimento da doença, dentre eles a capacidade de nidação e proliferação (sobrevivência) destas células<sup>14</sup>. Sendo assim, capacidade de nidação e proliferação, passam por sobrevivência, e sobrevivência de tecidos exógenos passa por processo inflamatório e sistema imune, o que tem sido objeto de discussão na literatura atual.

## **1.3 O Sistema Imune e a Etiopatogenia da Endometriose**

De acordo com Mihalyi et al.<sup>15</sup> há indícios atuais que propõem que disfunções do sistema imune, fatores genéticos e ambientais, possam resultar nesta implantação ectópica. As células endometriais intra-uterinas se proliferam mediante as flutuações hormonais do ciclo menstrual e, na ausência de fertilização ocorre o sangramento. Este

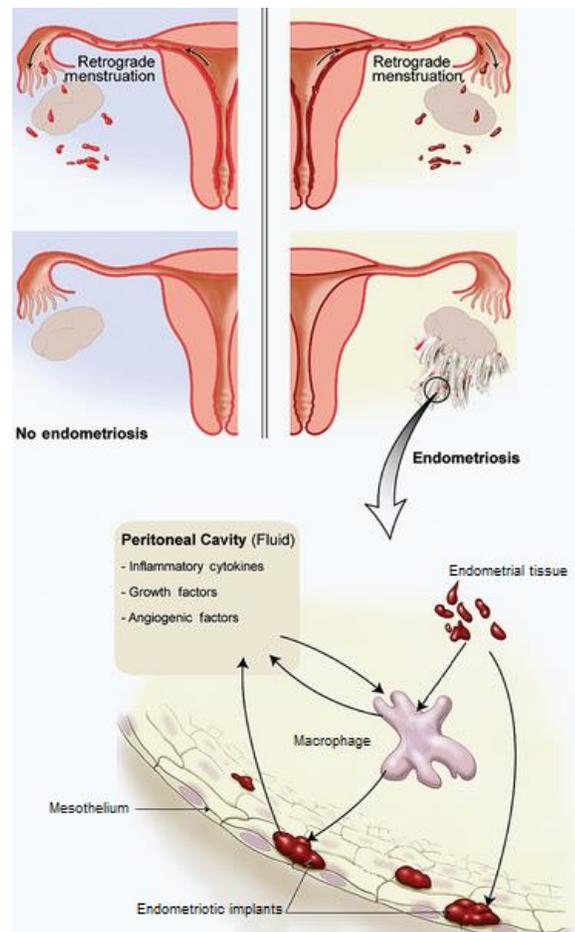
sangramento por sua vez, pode adentrar na cavidade abdominal (menstruação retrógrada), resultando no recrutamento de células imunológicas e sequente inflamação local<sup>16</sup>. Sugere-se que as células endometriais localizadas na cavidade deveriam ser identificadas como antígenos e submetidas à resposta imune local, porém por algum motivo ainda incerto, em algumas mulheres, estas células não são eliminadas corretamente, podendo acarretar no desenvolvimento de um implante endometrial<sup>17</sup>.

Evidências apresentadas pela literatura suportam a teoria relacionada ao sistema imune. Estudos demonstraram que a atividade fagocítica dos macrófagos encontra-se reduzida no fluido peritoneal de mulheres com endometriose, embora a sua quantidade e a produção de citocinas pró-inflamatórias se apresentam aumentadas, colaborando possivelmente na implantação e invasão do tecido endometrial ectópico<sup>18</sup>. Observou-se também que os macrófagos obtidos das pacientes com endometriose teriam maior expressão da molécula anti-apoptótica Bcl-2 (*B cell lymphoma-2*), uma proteína relacionada à resistência a apoptose, o que poderia explicar, em parte, o aumento dessa célula inflamatória no fluido peritoneal das pacientes com esta doença<sup>16</sup> (Figura 1).

Com respeito às células *Natural Killer* (NK), observou-se que estas estariam aumentadas em relação a sua quantidade, contudo a capacidade citotóxica contra células endometriais apresentaria reduzida em pacientes com endometriose.<sup>19</sup> Não somente a ação citotóxica dessas células seria deficitária, mas também as próprias células endometriais parecem ser mais resistentes a ação citotóxica.<sup>16</sup>

Ademais, as populações de células dendríticas maduras parecem estar com um decréscimo acentuado no endométrio de mulheres com endometriose e com um acréscimo significativo de células dendríticas imaturas. Células imaturas não desempenham o papel de apresentador de antígenos de maneira eficaz. Este déficit de células maduras observadas em mulheres com endometriose pode resultar em uma frequência insuficiente de apresentação de antígenos a linfócitos T, ou ainda na indução de tolerância imunológica nessas células, o que justificaria, parcialmente, a baixa responsividade das células do sistema imune frente às células endometriais ectópicas.<sup>20,21</sup>

Algumas citocinas têm sido investigadas e são comumente encontradas no fluido peritoneal de mulheres portadoras de endometriose<sup>22</sup>. A interleucina 6 (IL-6) é uma glicoproteína pró-inflamatória secretada por vários tipos de células, incluindo os macrófagos<sup>23</sup>. Esta citocina é um marcador da resposta inflamatória aguda e desempenha funções como a indução da expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)<sup>24</sup>. Níveis elevados de IL-6 podem resultar no aumento dos efeitos angiogênicos, o que permitiria o crescimento de células endometriais e a permanência do tecido endometriótico em local ectópico<sup>25</sup>. Assim como a interleucina 6, a interleucina 1 (IL-1) é uma proteína sintetizada por macrófagos locais. Estudos sugerem que a IL-1 também atuaria na promoção da angiogênese em lesões endometrióticas<sup>26</sup>. O fator de necrose tecidual (TNF- $\alpha$ ) também é uma citocina produzida principalmente por macrófagos ativos<sup>27</sup> que parece contribuir na promoção e adesão de células endometriais, além de estimular a angiogênese<sup>16</sup> e a produção das citocinas IL-1 e IL-6<sup>26</sup>.



**Figura 1.** A ilustração demonstra as células endometriais adentrando na cavidade peritoneal por meio da menstruação retrógrada. Em pacientes com endometriose estas células não são eliminadas corretamente pelo sistema imune local, acarretando no desenvolvimento de implantes endometriais. Adaptado de Hemmings e Falcone, 2015.<sup>28</sup>

#### 1.4 O Tratamento da Endometriose - Medicamentos Tradicionais e Novas Modalidades Experimentais

Não existe um consenso de qual seria o tratamento ideal para a endometriose. A indicação cirúrgica e as estratégias terapêuticas clínicas são dependentes de avaliações individuais<sup>29,30</sup>.

O tratamento medicamentoso da endometriose com hormônios visa bloquear o eixo hipotálamo - hipofisário, regredindo a lesão e levando à remissão dos sintomas<sup>31</sup>. Um exemplo amplamente utilizado no tratamento dessa moléstia é o acetato de leuprolide<sup>32</sup>, um nonapeptídeo sintético análogo do hormônio liberador de gonadotrofina

(GnRH), que visa suprimir o estímulo estrogênico, principal responsável pela manutenção e crescimento de focos endometrióticos, além de promover a indução à amenorreia por meio da inibição da secreção de gonadotrofina pituitária<sup>33</sup>. Contudo, tanto os efeitos adversos apresentados, como a ocorrência de sintomas similares aos encontrados na pós-menopausa, quanto os custos diferenciados (custos elevados) devem ser levados em consideração em relação à escolha terapêutica hormonal<sup>34</sup>. Cabe destacar que os agonistas do GnRH também são utilizados em pesquisas com modelos experimentais, em que se nota uma redução significativa de lesões endometriais após 21 dias de uso, como evidenciados nos estudos de Kondo et al.<sup>35</sup> Oktem et al.<sup>36</sup>

Os imunomoduladores são um exemplo de fármacos não hormonais utilizados para modular a resposta imune<sup>37</sup>. Dois tipos de imunomoduladores têm sido estudados no tratamento da endometriose: agentes que aumentam a ação citolítica do sistema imune e agentes que reduzem o componente inflamatório da doença. Porém, não há uma conclusão efetiva a respeito do emprego destes grupos de drogas como terapia essencial no tratamento da endometriose, já que não há dados disponíveis consistentes que sustentem sua utilização<sup>1</sup>. Neste grupo de medicamentos incluem a loxiribine e o inibidor do TNF- $\alpha$ <sup>38</sup>. A loxiribine é uma droga que estimula tanto a atividade das células NK, quanto à proliferação de linfócitos B e a citotoxicidade mediada por macrófagos<sup>39</sup>. Foi observada em estudo com modelo animal a redução significativa do tamanho do implante endometrial com o uso dessa substância, contudo os resultados não foram satisfatórios em humanos<sup>38</sup>. O TNF- $\alpha$  é uma citocina chave na indução do processo inflamatório que tem sido investigada em pacientes com endometriose, uma vez que sua concentração se encontra elevada no fluido peritoneal, sugerindo dessa maneira que a sua neutralização com bloqueadores do TNF- $\alpha$  teria efeito benéfico na endometriose, como a não progressão ou a regressão da doença em estágio inicial<sup>30</sup>. Estudos em roedores e babuínos demonstraram que o inibidor do TNF- $\alpha$  foi capaz de inibir o desenvolvimento da doença, porém Koninckx e colaboradores<sup>40</sup> realizaram um ensaio clínico randomizado, com o uso de infliximab (anticorpo monoclonal anti-TNF- $\alpha$ ) em 21 mulheres portadoras de endometriose com sintomatologia dolorosa importante e

nódulos retovaginal, cujos resultados sugerem que o infliximab não foi efetivo no tratamento da dor associada à doença.

Ainda não há opções terapêuticas disponíveis para a melhora da fertilidade e poucas se propõem a reduzir o estadió da doença, principalmente quando há o comprometimento dos ovários e intestino. As drogas utilizadas atualmente no tratamento da endometriose são efetivas na redução dos sintomas, porém a recorrência das manifestações dolorosas é comum após a interrupção do tratamento clínico<sup>2330</sup>. Busca-se, desse modo, novas opções terapêuticas para um melhor controle e tratamento da doença.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto terapêutico que pode ser adquirido de modo autólogo com ação na atividade inflamatória<sup>41</sup>. Sua obtenção consiste em uma técnica simples e rápida (de 20 a 30 minutos), visto que a metodologia manual preconiza duas centrifugações do sangue total, resultando por meio da diferença de densidade, em um produto final com um pequeno volume de plasma e concentração plaquetária acima dos níveis fisiológicos, além de ser uma alternativa de baixo custo de fatores de crescimento (FC)<sup>42</sup>. Sua utilização na medicina humana tem sido estudada e aplicada no âmbito da cirurgia plástica e em outras áreas da saúde, especialmente no de regeneração tecidual, por permitir um processo de cicatrização mais rápida e eficiente, favorecer a integração de retalhos e enxertos, sejam ósseos, cutâneos ou cartilagosos, além de auxiliar na modulação da inflamação<sup>43,44</sup>. Pesquisas recentes revelam que o PRP também promove o crescimento endometrial, bem como melhora o desfecho da gravidez durante o processo fertilização *in vitro*.<sup>45</sup>

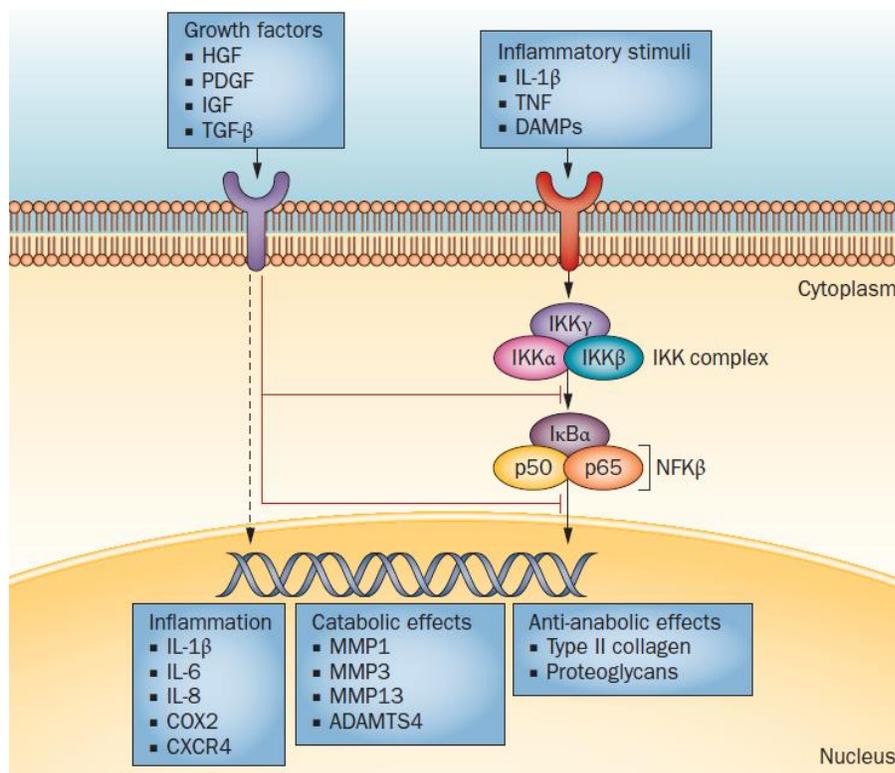
As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados produzidos a partir dos megacariócitos, sendo liberadas diretamente na corrente sanguínea sob a forma discóide ao redor do espaço hematopoiético medular<sup>46</sup>. Sua estrutura intracelular é constituída, entre outras, por uma zona denominada de zona de organelas, a qual consiste basicamente de grânulos- $\alpha$ . Estes, por sua vez, são responsáveis pela liberação de fatores de crescimento, proteínas bioativas, que promovem a proliferação e diferenciação celular, reparo e regeneração do tecido lesado<sup>47, 48</sup>.

Bendinelli e colaboradores<sup>49</sup> observaram em seu estudo, aspectos relacionados ao efeito anti-inflamatório do PRP em condrócitos humanos, dado que o fator de

crescimento hepático (HGF), um FC presente abundantemente nas plaquetas, auxiliaria na supressão da inflamação por aumentar a expressão da proteína inibitória Kappa B - Alfa (I $\kappa$ B $\alpha$ ), o que contribuiria por manter a subunidade p65 do fator de transcrição nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) no citosol, inviabilizando sua translocação para o núcleo da célula e conseqüentemente impedindo a atividade de expressão gênica. Corroborando com esse achado, Andia e Maffulli<sup>50</sup>, verificaram o efeito anti-inflamatório do PRP na osteoartrite experimental, por meio do silenciamento da subunidade p65, promovendo a redução da indução de interleucina-1 Beta (IL-1 $\beta$ ) e TNF- $\alpha$  no fluido sinovial e inflamação sinovial.

O fator de transcrição NF- $\kappa$ B é um heterodímero que tem como papel fundamental o de regular a expressão de genes essenciais no processo inflamatório<sup>51</sup>. Seu protótipo clássico é composto por duas subunidades, às chamadas p50 e p65<sup>52</sup>. Quando não estimulado, os dímeros de NF- $\kappa$ B (p50 e p65) encontram-se no citosol complexados à uma proteína inibitória da família kappa Bs, em sua maioria à I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>53</sup>. Uma vez ativado por uma variedade de estímulos extracelulares, incluindo citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e a IL-1, ocorre a fosforilação e, por conseguinte a degradação da proteína inibitória Kappa B (I $\kappa$ B), o qual conduz à liberação do heterodímero (p50/p65/I $\kappa$ B). O desmembramento do complexo p50/ p65/I $\kappa$ B permite a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo, que por sua vez, liga-se à região promotora dos genes alvos, aumentando a transcrição de mediadores pró-inflamatórias<sup>54</sup> (Figura 2).

Outros fatores de crescimento contidos no PRP, como o fator de crescimento Beta 1 (TGF- $\beta$ 1), fator de crescimento Insulina 1 (IGF-1) e fator de crescimento derivado de Plaquetas (PDGF), parecem apresentar atividade anti-inflamatória<sup>55</sup>. O TGF- $\beta$ 1 e o IGF-1 afetariam as vias de sinalização de IL-1 em condrócitos *in vitro*<sup>56</sup> e o PDGF e TGF- $\beta$ 1 inibiriam o IKK $\alpha$ , proteína quinase específica responsável pela fosforilação de I $\kappa$ B, suprimindo a ativação de NF- $\kappa$ B e transcrição de seus alvos envolvidos na inflamação<sup>50</sup>.



**Figura 2.** Atividade anti-inflamatória do PRP. O NF-κB é ativado por meio de estímulos extracelulares, como por exemplo, as citocinas IL-1β e TNF-α. Uma vez ativado, o NF-κB é translocado para o interior do núcleo ligando-se à região promotora dos genes alvos, aumentando a transcrição de mediadores pró-inflamatórios. O PRP inibiria a cascata de ativação do NF-κB.<sup>50</sup>

Se por um lado o PRP parece estar ligado à modulação da inflamação, por outro, alguns componentes existentes no PRP sugerem que este possui efeitos pró-inflamatórios. Três proteínas plasmáticas ( $\alpha$ -2-macroglobulina,  $\alpha$ -1-microglobulina e proteína de ligação à vitamina D) ativariam os macrófagos por meio do receptor Toll-like 4 (TLR4), o que induziria à expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 estimulando, portanto, a inflamação<sup>50</sup>. Ainda neste contexto inflamatório, estudos recentes apontam que a molécula de adesão P-selectina, contida nos  $\alpha$ -grânulos e expressa na superfície da membrana das plaquetas ativadas se liga à Ligante 1 da Glicoproteína P-selectina (PSGL-1) na superfície dos leucócitos promovendo, por exemplo a regulação da produção de citocinas por monócitos<sup>57,58</sup>. Outro papel não tradicional das plaquetas, é a de sintetizar a IL-1 $\beta$ , o qual poderia promover à indução de respotas inflamatórias em células endoteliais humanas<sup>59</sup>.

## **1.5 Os Modelos Animais de Endometriose**

Os modelos animais permitem o estudo de eventos envolvendo a fisiopatologia da endometriose, bem como a avaliação de novas abordagens terapêuticas<sup>60</sup>. Sabe-se que essa doença se desenvolve de forma espontânea em primatas, porém o custo é dispendioso para o uso experimental<sup>61</sup>. A técnica cirúrgica de indução da endometriose estabelecida por Jones<sup>62</sup>, é um método eficaz e reprodutível, o qual consiste no autotransplante de segmentos uterinos à cavidade peritoneal das ratas. A real correlação existente entre a endometriose observada em mulheres e os implantes de tecido endometrial induzidos cirurgicamente em modelo animal (ratas) é incerta. Contudo, sua utilização em protocolos de pesquisa é justificada, dado que a avaliação e acompanhamento da endometriose em humanos é difícil e muitas vezes não factível, uma vez que o diagnóstico se dá de forma invasiva<sup>30</sup>.

## **1.6 A Hipótese do Estudo**

Como se depreende dos dados de literatura, a endometriose é uma doença caracterizada por uma resposta inflamatória exacerbada em que as manifestações clínicas (sintoma de dor e infertilidade) são decorrentes desse processo inflamatório crônico. É uma condição que possui relevância epidemiológica, visto que sua prevalência na população mundial é estimada em 10% das mulheres em idade reprodutiva. Embora a sua fisiopatologia seja pouco compreendida, a habilidade dos implantes endometrióticos se desenvolverem em localizações ectópicas pode estar relacionada à imunorreatividade decorrente das próprias lesões. Os tratamentos disponíveis visam aliviar os sintomas, porém não há até o momento nenhum tratamento que garanta a cura permanente da doença, o que justifica a busca de novas alternativas terapêuticas. Sendo assim, o PRP poderia ser uma alternativa de tratamento, visto a sua ação sobre o processo inflamatório e de reparo tecidual.

## **2 OBJETIVO**

Comparar os efeitos do uso do PRP e do acetato de leuprolide sobre os implantes endometrióicos em modelo experimental de endometriose peritoneal em ratas Wistar por meio de análise morfológica e imunoistoquímica.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar os aspectos macroscópicos dos implantes endometrióicos com o emprego do PRP e acetato de leuprolide, em ratas com endometriose peritoneal;
- Analisar semiquantitativamente (classificação de Keenan), do ponto de vista histopatológico, os implantes endometrióicos após o tratamento com PRP e acetato de leuprolide, em ratas com endometriose peritoneal;
- Avaliar a expressão tecidual de citocinas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) nas lesões de endometriose, por meio de ensaios imunoistoquímicos, após o tratamento com PRP e acetato de leuprolide, em ratas com endometriose peritoneal;
- Estimar as contagens celulares (células CD68+, CD4+, CDF+ e CD56+) no estroma das lesões de endometriose, por meio de ensaios imunoistoquímicos, após o tratamento com PRP e acetato de leuprolide, em ratas com endometriose peritoneal.

### **3 MÉTODO**

Este estudo experimental foi submetido à aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CEUA) obedecendo às orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Sessenta ratas da espécie *Rattus norvegicus albinus* (Wistar), com três meses de idade, nulíparas e com o peso entre 200 e 250g, procedentes do Biotério da PUCPR, foram submetidas à cirurgia de indução de endometriose peritoneal.

As roedoras foram mantidas em caixas de polipropileno, medindo 43cm (P) x 34cm (L) x 16cm (A), com tampa de grade de ferro galvanizado, espaçamento entre a grade de 0,7cm e cocho de ração na parte anterior em formato de "V". A cama era composta por cepilho/maravalha esterilizado de pinus, sem casca e com 2% no máximo de pó. Cada gaiola acondicionou cinco animais, sendo estes alimentados com ração Nuvilab CR1 da marca Quimtia e água filtrada proveniente da rede pública de abastecimento. O macroambiente possuía controle de temperatura (em torno de 21°C), ventilação (10 a 15 trocas de ar por hora), ciclos de luminosidade (claro e escuro de 12 horas cada) e ruído (65dB).

#### **3.1 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS**

Os experimentos ocorreram no Laboratório de Cirurgia Experimental da Disciplina de Técnica Operatória, na Escola de Saúde e Biociências, da PUCPR, em três etapas, conforme a Figura 3.



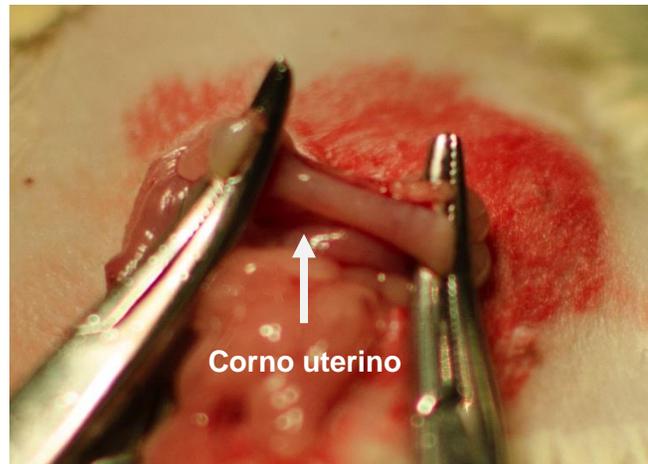
**Figura 3.** Etapas dos procedimentos cirúrgicos desde indução cirúrgica da endometriose, diagnóstico e tratamento.

### 3.1.1 Primeira Cirurgia

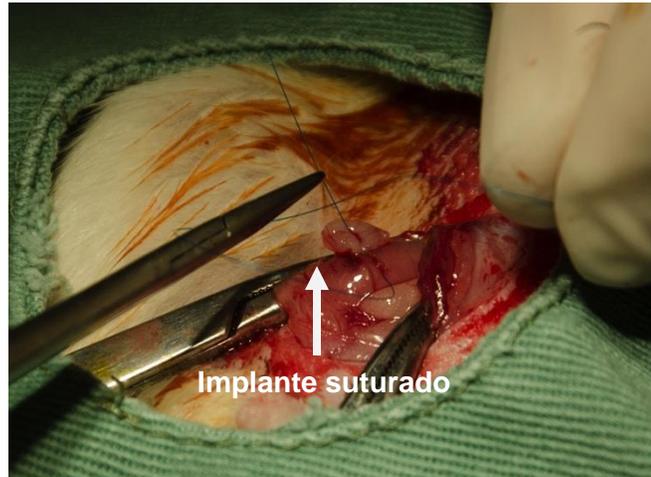
Após o período de adaptação de três dias, foi iniciado o procedimento cirúrgico de indução da endometriose, consoante à metodologia preconizada por Jones<sup>62</sup> e adaptada por Amaral et al.<sup>63</sup>. Como pré-operatório foi instituído um jejum de 12 horas.

Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de cetamina (80mg/kg) e xilazina (8mg/kg), sendo imobilizados à mesa cirúrgica em decúbito dorsal.

Posteriormente, foi efetuada a tricotomia e antissepsia da região abdominal a ser operada, utilizando solução de povidone-iodine com 1% de iodo ativo. Com o animal em posição cirúrgica, foi feita uma incisão longitudinal na linha Alba de aproximadamente 2cm para exposição dos cornos uterinos (Figura 4). Os vasos sanguíneos do corno direito foram ligados com vicryl 3-0 e um segmento de 2cm do terço médio deste corno foi ressecado e aberto longitudinalmente, dando origem a uma peça de 5x5mm (0,25cm<sup>2</sup>). O implante foi suturado no peritônio parietal do lado esquerdo, próximo ao trato reprodutivo do animal, com o auxílio de prolene 5-0, de modo que a face endometrial ficasse exposta à cavidade abdominal (Figura 5).



**Figura 4.** Exposição do corno uterino direito. Fonte: a autora, 2015.



**Figura 5.** Implante endometrial suturado na cavidade peritoneal do lado esquerdo da rata. Fonte: a autora, 2015.

Realizada a checagem da hemostasia do corno uterino e assepsia da cavidade abdominal, a sutura da mesma foi efetuada, sendo o músculo-aponeurótico suturado com pontos contínuos de Mono nylon 3-0 e a pele com pontos separados de fio de algodão.

A analgesia pós-operatória foi efetuada com a aplicação de dipirona sódica (100mg/kg), por via subcutânea, posterior os procedimentos cirúrgicos e após 24 horas de pós-operatório.

Os animais foram levados ao Biotério permanecendo neste ambiente sem restrição alimentícia, nem administração de qualquer suplementação hormonal ou medicamentosa.

Na data do segundo procedimento, antes de se realizar as cirurgias, os animais foram distribuídos de forma randomizada em três grupos, conforme a divisão demonstrada na Tabela 1:

**Tabela 1.** Distribuição dos grupos conforme tratamento.

<b>Modelo</b>	<b>N</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Localização</b>
60 ratas	20	PRP (0,05ml)	Intralesional
	20	Leuprolide (1mg/kg)	Subcutânea
	20	Controle (0,2ml de solução salina 0,9%)	Intraperitoneal

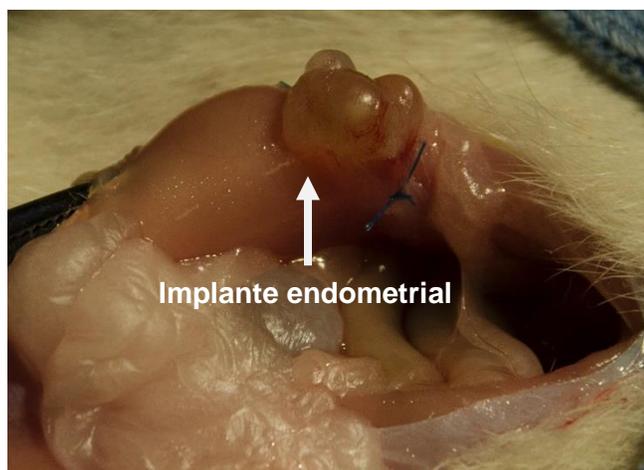
Os animais selecionados aleatoriamente foram divididos nos seguintes grupos:

- a) Grupo PRP (Grupo PRP): as ratas foram submetidas ao tratamento de uma solução injetável no local da lesão de 0,05ml de PRP. b) Grupo análogo (Grupo L): as ratas foram tratadas com o agonista do GnRH, com uma injeção subcutânea única de acetato de leuprolide (1mg/kg de peso corporal; Lupron Depot 3,75mg - Abbott). A dose proposta de leuprolide foi fundamentada no estudo de Dogan et al.<sup>64</sup>. c) Grupo controle (Grupo C): as ratas receberam uma injeção intraperitoneal de 0,2ml de solução salina 0,9% próximo ao implante.

### **3.1.2 Segunda Cirurgia**

Passados 21 dias da indução da doença, os animais foram submetidos à laparotomias medianas, conforme descrito anteriormente.

As lesões foram localizadas com a finalidade de se comprovar macroscopicamente o desenvolvimento, bem como se verificar a viabilidade do implante endometriótico (Figura 6). A área de superfície dos implantes foi aferida com o auxílio de um paquímetro e anotada na unidade de comprimento em milímetros (largura x comprimento).



**Figura 6.** Comprovação macroscópica do desenvolvimento do implante. Fonte: a autora, 2015.

Um animal foi submetido à punção cardíaca, para que se pudesse obter o PRP. A técnica de preparo do PRP está descrita no item 3.2.

Em seguida, foi administrada uma injeção de 0,05ml de PRP no local do implante no Grupo PRP, uma injeção subcutânea de acetato de leuprolide (1mg/kg) no Grupo L e no Grupo C uma injeção intraperitoneal de 0,2ml de solução salina.

### **3.1.3 Terceira Cirurgia**

No 60º dia após a indução da endometriose, os animais foram submetidos novamente à laparotomias medianas para se avaliar o efeito dos tratamentos nas lesões endometrióticas, por meio da medição da área de superfície. Os implantes foram excisados, fixados em formaldeído a 10% e processados para inclusão em parafina, para posterior análise morfológica, junto aos responsáveis do Laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR.

Os animais sofreram eutanásia com dose letal de 250mg/kg de Tiopental sódico por via intraperitoneal após o término dos procedimentos.

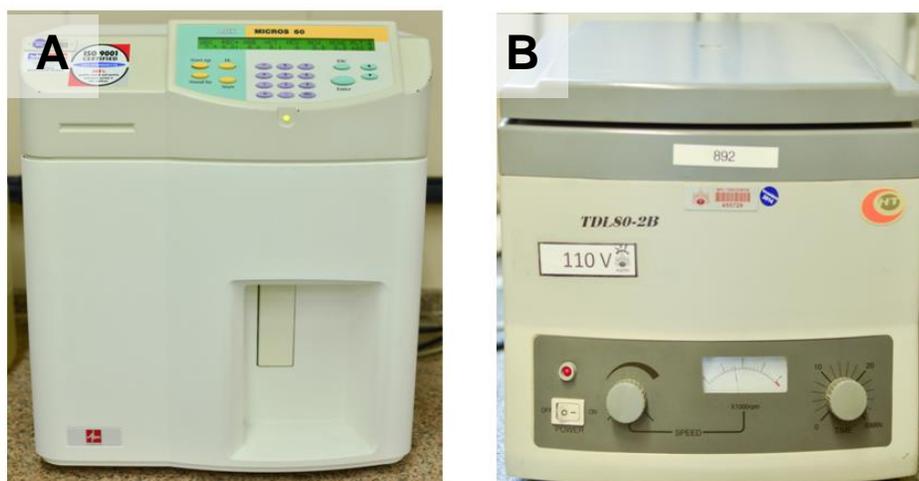
## **3.2 PREPARO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)**

Conforme proposto nos estudos Atalay et al.<sup>65</sup>, foi utilizado na presente pesquisa, uma amostra de sangue total de apenas um animal para se realizar o procedimento de obtenção do PRP. A rata do Grupo PRP foi selecionada de forma randomizada, sendo após, anestesiada com cetamina (80mg/kg) e xilazina (8mg/kg). A aspiração cardíaca

foi efetuada, coletando-se 7ml de sangue e transferindo-o imediatamente para dois tubos à vácuo de citrato de sódio 3,2% (volume de aspiração: 3,5ml - Vacuette do Brasil), seguido de homogeneização. Após, o sangue anticoagulado foi submetido à contagem de células no aparelho ABX Micros 60 (HORIBA ABX), a fim de se quantificar as plaquetas antes da execução da técnica de enriquecimento (Figura 7A).

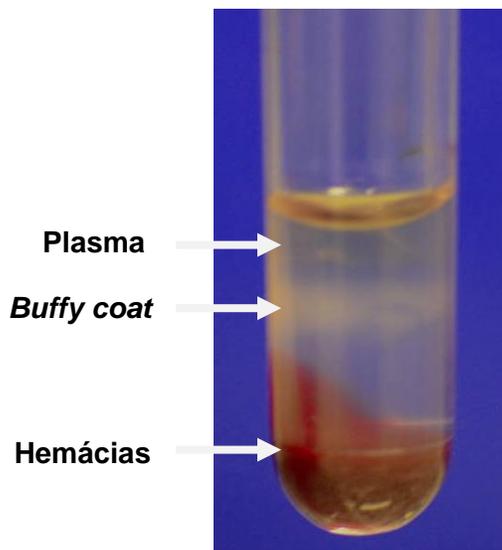
Posteriormente, foi pipetado com o auxílio de uma pipeta Pasteur, 0,5ml de Ficoll Paque™ PLUS (reagente empregado para a separação de células, por densidade de gradiente de centrifugação) em um tubo plástico de 5ml e seguidamente o sangue foi deslocado para o tubo.

A centrífuga utilizada para a preparação do PRP foi a HT TDL 80-2B (Figura 7B) e a força e o tempo das centrifugações usados foram as determinadas por Vendramin et al<sup>66</sup>.



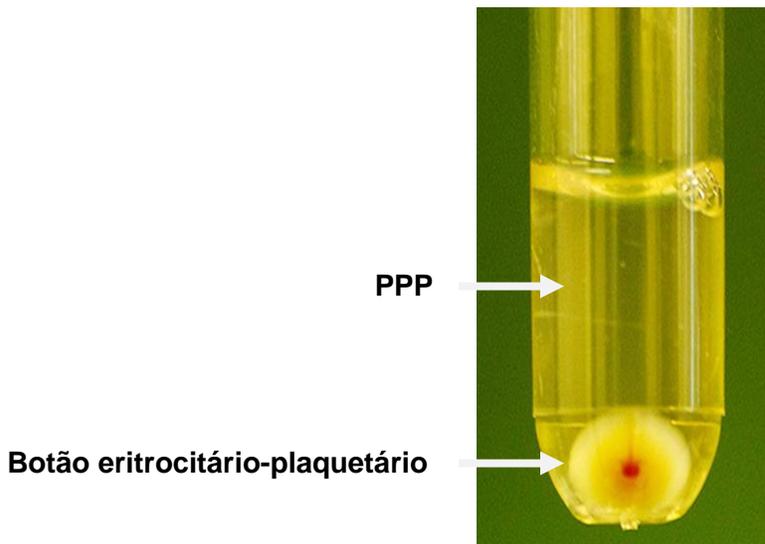
**Figura 7.** A) Centrífuga HT TDL 80-2B; B) Centrífuga HT TDL 80-2B. Fonte: a autora, 2015.

A primeira centrifugação foi realizada a 400g (800rpm), por 10 minutos. Foi observada a formação de três fases conforme o gradiente de densidade de seus constituintes: a fase inferior composta por hemácias, a intermediária referida como zona névoa (*buffy coat*), contendo plaquetas e leucócitos e a superior representada por plasma e plaquetas (Figura 8). As frações correspondentes às fases superior e intermediária foram aspiradas com o auxílio de uma micropipeta de volume variável de 50-200µl e transferidas para um tubo plástico de 5ml. O volume restante contendo hemácias foi desprezado.



**Figura 8.** Tubo de ensaio após a primeira centrifugação. A fase superior contendo plasma e plaquetas, a intermediária composta pela zona névoa e a inferior representada por hemácias. Fonte: a autora, 2015.

A segunda centrifugação foi realizada com uma força de 800g (1600rpm) e tempo de 10 minutos obtendo-se o plasma pobre em plaquetas (PPP), evidenciado na região superior do tubo e um botão eritrocítico - plaquetário no fundo do tubo (Figura 9). Dois terços do PPP foram descartados e o volume resultante foi homogeneizado brandamente resultando na obtenção do PRP.



**Figura 9.** Detalhe do plasma obtido após a segunda centrifugação. Botão eritrocitário-plaquetário e PPP em cerca de dois terços da região superior do tubo. Fonte: a autora, 2015.

Nova contagem no aparelho ABX Micros 60 foi efetuada, com o intuito de se constatar o enriquecimento de plaquetas, como estão representados nas Figuras 10 e 11.



Figura 10. Visualização do número de plaquetas (462.000/mm<sup>3</sup>) após a coleta de sangue da rata.



Figura 11. Visualização do enriquecimento do número de plaquetas (2.852.000/mm<sup>3</sup>) após o procedimento de obtenção do PRP.

Foi obtida uma concentração plaquetária em média 517% maior do que a visualizada no sangue do animal (antes da técnica de enriquecimento).

O preparo do PRP está representado de forma esquemática de acordo com a Figura 12.

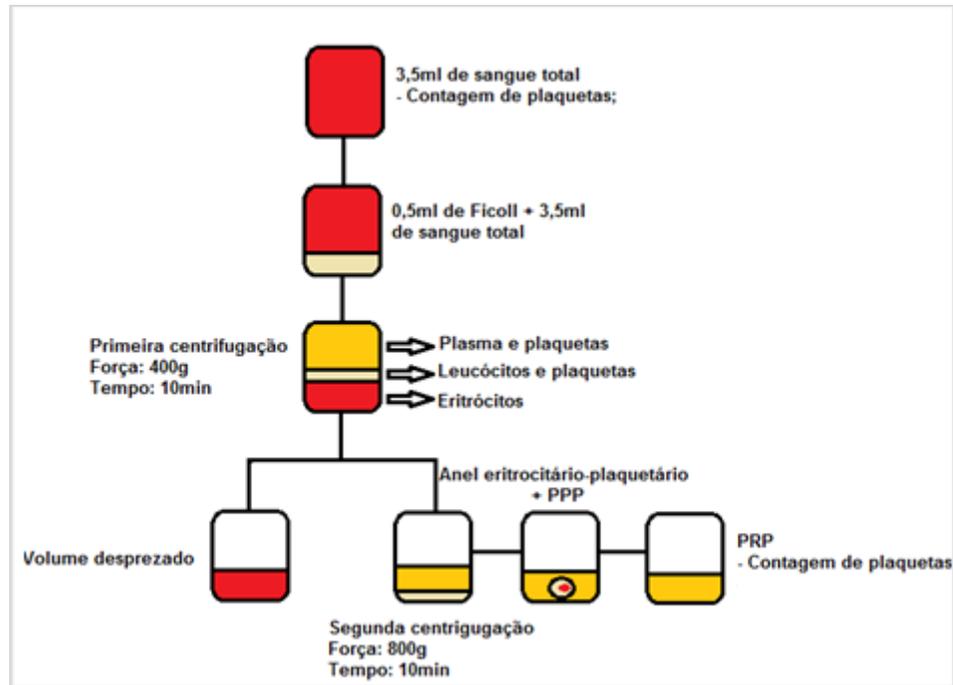


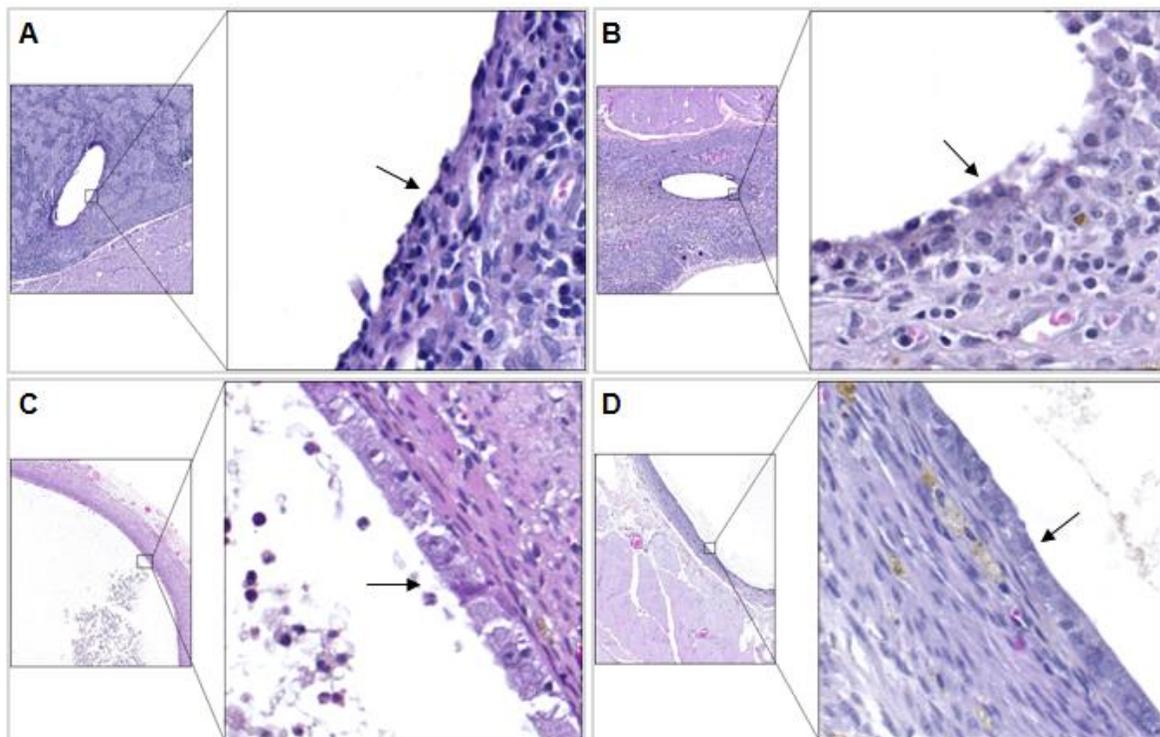
Figura 12. Etapas do processo de obtenção do PRP. Fonte: a autora, 2015.

### 3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA - METODOLOGIA DE KEENAN

Os implantes endometriais excisados e fixados em formaldeído a 10% foram incluídos em blocos de parafina, seccionados em uma espessura de 5µm (4 cortes por amostras), corados com hematoxilina e eosina e examinados com o auxílio do microscópio óptico AXIO Vision. A persistência de células epiteliais nos implantes endometriais foi avaliada semiquantitativamente, de acordo com a classificação proposta por Keenan et al.<sup>57</sup>.

- Escore 3: camada epitelial bem preservada;
- Escore 2: epitélio moderadamente preservado com infiltrado leucocitário;
- Escore 1: epitélio mal preservado;
- Escore 0: ausência de epitélio.

A Figura 13 evidencia a avaliação histopatológica dos implantes endometrióticos. Deve-se ressaltar que a patologista designada para analisar as amostras desconhecia os grupos de tratamento.



**Figura 13.** Avaliação histopatológica dos implantes endometrióticos. (A) Escore 0, (B) Escore 1, (C) Escore 2, (D) Escore 3. Aumento de 10x e 400x respectivamente. Fonte: a autora, 2016.

### 3.4 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Para realizar a análise imunoistoquímica das amostras foi utilizado o arranjo em matriz de amostras teciduais, ou tissue microarray (TMA), descrita por Kononen et al.<sup>67</sup>. Esse teste se baseia na confecção de blocos multiamostrais, contendo fragmentos cilíndricos de amostras teciduais, em um único bloco de parafina. Os cilindros teciduais são dispostos no bloco receptor seguindo uma ordem pré-determinada.

Este teste foi utilizado com o material obtido dos animais dos três grupos estudados (PRP, Leuprolide e controle).

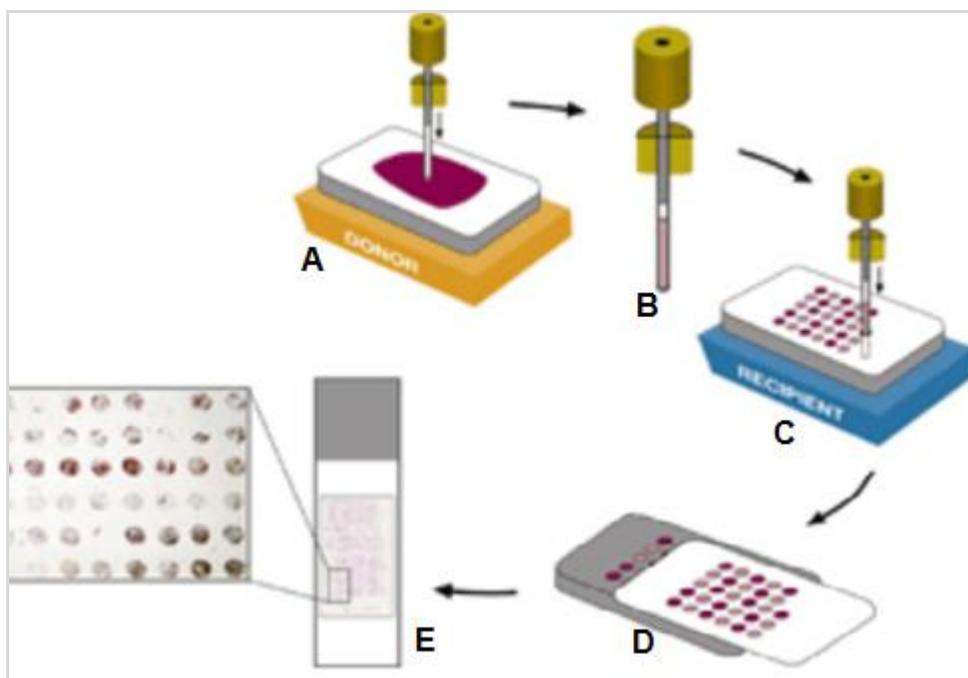
#### 3.4.1 Técnica de preparo do TMA

Primeiramente, o implante endometrial foi identificado por meio da análise histológica. A partir dos blocos de parafina contendo os cistos endometrióticos, foram realizados cortes sequenciais de 4 $\mu$ m com o auxílio de uma placa fria (Leica EG1130,

Germany), um micrótomo (Reichert-Jung 2030, Bicut, Germany) e uma lâmina cortante (Marienfeld), elaborando dessa maneira as lâminas coradas com HE (hematoxilina-eosina). Estas foram analisadas ao microscópio óptico, em que se selecionou e se delimitou a área (parede do cisto endometriótico) a ser preparada em TMA.

Em seguida, foi organizado um mapa em plano cartesiano com a localização em que cada exemplar teria no TMA. Por meio de uma broca Trefina Neodent®, cilíndrica, de 3mm de diâmetro acoplada a uma caneta-pino-chave e a um motor de suspensão de 130 watts, da marca Bethil®, as amostras selecionadas foram puncionadas e posicionadas em uma forma metálica conforme o mapa de localização. Esta foi preenchida com parafina líquida a 60°C e alocada, após, em uma placa de gelo à temperatura de -10°C negativos durante 30 minutos, para que ocorresse a solidificação da parafina, concluindo dessa maneira a confecção do TMA.

A técnica de confecção do TMA está representada esquematicamente na Figura 14.



**Figura 14.** Confecção do TMA. (A). Bloco doador, dos quais são retirados fragmentos da amostra. (B) Broca cilíndrica, utilizada para retirar os fragmentos e construir o bloco receptor. (C) Bloco receptor, contempla os microarranjos das amostras, possui linhas e colunas previamente identificadas por um mapa em plano cartesiano. (E) Lâmina do TMA concluída. Fonte: a autora, 2016.

### 3.4.2 Realização dos ensaios imunoistoquímicos com Interleucinas pró-inflamatórias

Para realizar os ensaios imunoistoquímicos, as lâminas que foram preparadas para este propósito foram submetidas à desparafinização com xilol, à desidratação com banhos sucessivos de álcool e à reidratação com água. Após, foram imersas em álcool metílico e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para que ocorresse o bloqueio da peroxidase endógena.

Posteriormente, as lâminas foram incubadas com os anticorpos anti-interleucinas selecionadas e devidamente diluídas pelos responsáveis de protocolos do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR. (Tabela 2), sendo então acondicionadas em câmara úmida com temperaturas de 2 e 8°C, durante o período noturno.

**Tabela 2.** Interleucinas e condições empregadas nos testes imunoistoquímicos.

<b>Interleucina</b>	<b>Especificação</b>	<b>Marca</b>	<b>Diluição</b>
IL 1 $\alpha$	Rabbit (polyclonal)	Abcam ®	1:200
IL-1 $\beta$	Rabbit (polyclonal)	Abcam ®	1:100
IL-6	Mouse (monoclonal)	Imuny® biotechnology	1:200
TNF- $\alpha$	Mouse (monoclonal)	ThermoFisher Scientific	1:50

Um polímero de revelação, composto por duas soluções (*complement* e *conjugate*) foi adicionado após a incubação com os anticorpos primários. A seguir, foi acrescentado o complexo DAB + substrato sobre as lâminas e a contra-coloração foi feita com hematoxilina de Harris, seguida de desidratação em imersão de álcool etílico 100% e clarificação com xilol.

### 3.4.3 Análise Morfométrica

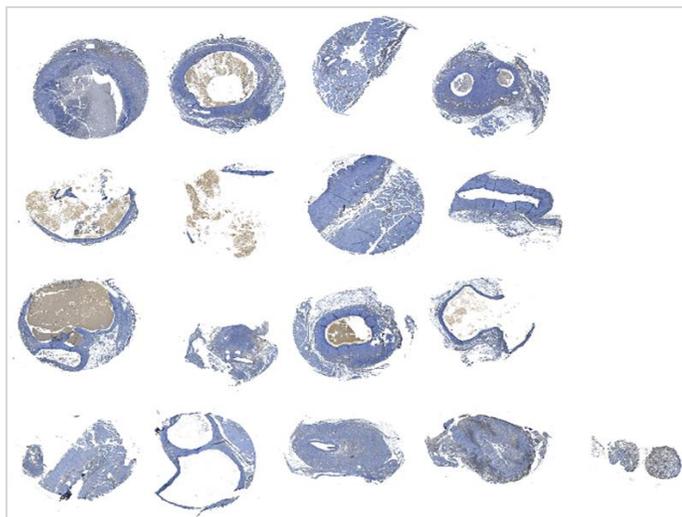
Para se avaliar quantitativamente a área de expressão das interleucinas, utilizou-se no presente estudo a técnica de morfometria.

Desse modo, as lâminas submetidas à imunoistoquímica com os anticorpos anti-citocinas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) dos grupos pertencentes ao PRP, acetato de leuprolide e controle, foram digitalizadas no scanner Axio Scan.Z1 (Carl Zeiss - Oberkochen, Alemanha) obtendo-se um mosaico de imagens (Figura 15) que posteriormente foi fragmentado em centenas de fotos por caso, a fim de se facilitar a

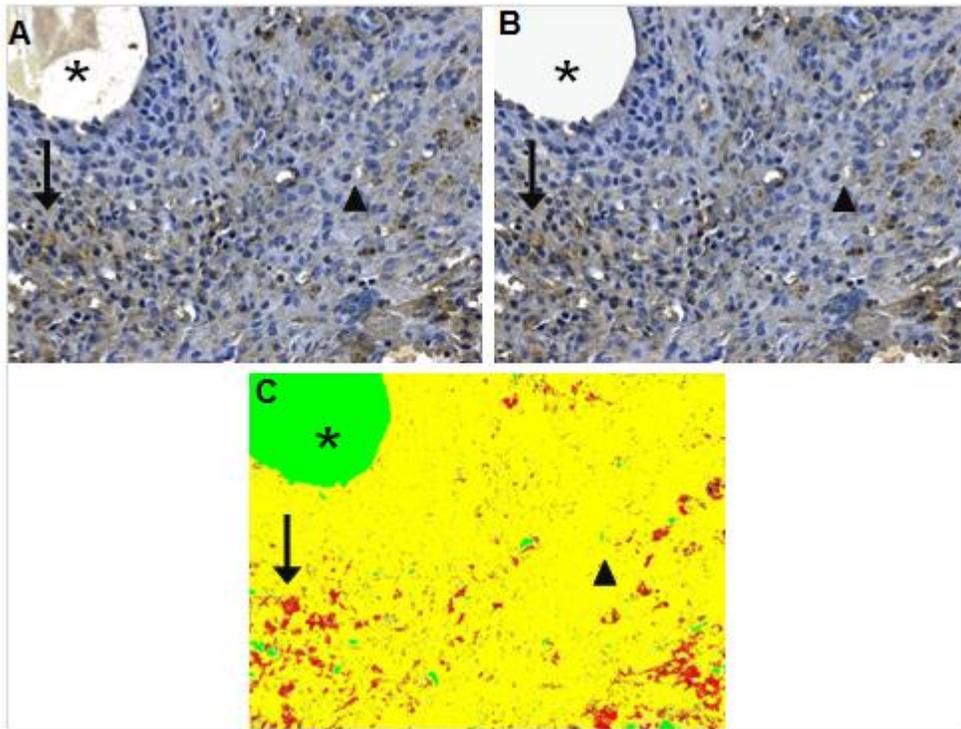
visualização da área pesquisada e excluir as imagens que continham dobraduras, espaços em branco e artefatos (Figura 16a).

Estas imagens foram otimizadas com o auxílio do software Adobe Photoshop CS6 v 13.0® (San Jose, Califórnia, USA) (Figura 16b) por meio do corte do conteúdo da luz do cisto endometriótico, com o intuito de se obter uma análise específica da região de interesse (parede do cisto).

Em seguida, as imagens foram avaliadas mediante o *software* Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics ® - Rockville, Maryland, USA) pela ferramenta morfometria de cores. Esta ferramenta possibilita analisar a expressão tecidual imunoistoquímica baseada na imunopositividade apresentadas nos tecidos, por meio de uma máscara (Figura 16c). Esta máscara marca com a cor vermelha as áreas positivas (demonstrado nas imagens da Figura 16 com o símbolo "↓"), com a cor amarela as áreas negativas (demonstrado nas imagens da Figura 16 com o símbolo "▲") e com a cor verde as áreas sem tecido (demonstrado nas imagens da Figura 16 com o símbolo "\*"), sendo então aplicada em todos os exemplares fotográficos. Para cada imagem, o programa gerava uma porcentagem das áreas citadas.



**Figura 15.** Lâmina de TMA digitalizada demonstrando os vários implantes de diversos animais em uma mesma lâmina. Observe que neste aumento panorâmico os implantes são em sua maioria císticos.  
Fonte: a autora, 2016.



**Figura 16.** Análise morfométrica. (A) Imagem da lâmina imunocorada com o anticorpo anti-interleucina 6 (IL- 6) através da técnica de imunohistoquímica. (B) Imagem otimizada com o auxílio do software Adobe Photoshop CS6 v 13.0®. (C) Imagem submetida à máscara para análise morfométrica onde a cor verde representa a ausência de tecido ou luz do cisto endometriótico, a cor amarela representa o tecido negativo para IL-6 e a cor vermelha demonstra as áreas que apresentam imunoexpressão tecidual para IL-6. Fonte: a autora, 2016.

Os valores adquiridos foram exportados para o Microsoft Office Excel 2007 e organizados em planilhas para a realização da análise estatística, a qual utilizou a médias e medianas dos percentuais de todas as amostras disponíveis.

#### **3.4.4 Realização dos ensaios imunohistoquímicos com anticorpos primários anti CD4, CD56, CD68 e CDF.**

A preparação das lâminas contemplando os anticorpos primários se deu conforme descrito no tópico 3.4.2.

Na tabela 3 constam os dados referentes às condições empregadas nos testes imunohistoquímicos.

**Tabela 3.** Marcadores e condições empregadas nos testes imunoistoquímicos.

<b>Interleucina</b>	<b>Especificação</b>	<b>Marca</b>	<b>Diluição</b>
CD4*	Clone 4B12	Dako	Pré-diluído
CD56**	Clone 123C3	Dako	Pré-diluído
CD68***	Clone PG-M1	Dako	Pré-diluído
CDF****	Clone CNA.42	Dako	Pré-diluído

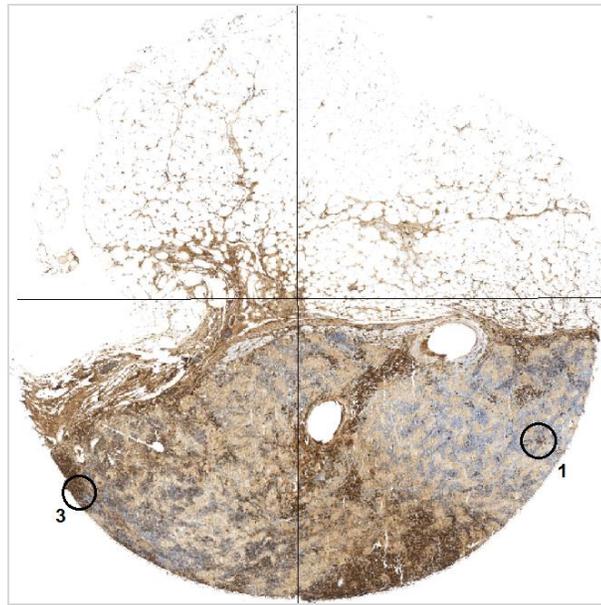
\*CD4: Marcador de linfócito Th.; \*\*CD56: Marcador de NK Cells; \*\*\*CD68: Marcador de monócito/macrófago; \*\*\*\*CDF: Marcador de células dendríticas.

### **3.4.5 Avaliação quantitativa das células inflamatórias no estroma da lesão endometriótica.**

Primeiramente, para se realizar a análise quantitativa dos marcadores, as lâminas submetidas à imunoistoquímica foram digitalizadas no programa Zen 2.3 lite. Os cistos endometrióticos foram localizados e divididos em quatro quadrantes. Em cada quadrante foi realizada a leitura de dois campos (x 100) do estroma, contabilizando-se o número de células inflamatórias e transpondo o valor obtido em escore, de acordo com o trabalho proposto por Vizzotto et al.<sup>68</sup> (Figura 17).

Os índices foram classificados em: acentuado (score 3: +50 células por campo de grande aumento); moderado (score 2: entre 25 - 50 células por campo de grande aumento); discreto (score 1: 1-25 células por campo de grande aumento) e; ausente (score 0: ausência de célula inflamatória por campo de grande aumento).

Ao final, se somavam os valores obtidos dos quadrantes e se dividia pelo número total de campos do cisto, exportando os resultados para uma planilha do Microsoft Office Excel 2007 a fim de se efetuar a análise estatística.



**Figura 17.** Cisto endometriótico corado com anticorpo anti CD56 e dividido em quatro quadrantes. A leitura das células inflamatórias CD56+ no estroma do cisto, neste caso, foi realizada, selecionando-se campos apenas nos quadrantes inferiores. Os escores que representam o número de células positivas por campo variaram entre 1 e 3, conforme o exemplo demonstrado pelos círculos. Fonte: a autora, 2016.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram descritos por médias, desvios padrões, medianas e amplitudes. Para a comparação dos grupos em relação a variáveis contínuas foi usado o modelo de análise da variância (ANOVA) com um fator ou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, dependendo da condição de normalidade que foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para análise do grau de Keenan os grupos foram comparados dois a dois considerando-se o teste exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de 0,05 sendo corrigido por Bonferroni para as comparações múltiplas dos grupos quanto ao grau de Keenan ( $p < 0,017$  indicaram significância estatística). Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.

## 4 RESULTADOS

Doze das sessenta ratas que foram submetidas ao procedimento de indução à endometriose foram excluídas no presente estudo, dado que para se obter o PRP foi utilizado o sangue de um animal (7ml), deixando-o inapto para prosseguir com a pesquisa, oito morreram entre a primeira e a segunda cirurgia e três desenvolveram abscesso em torno da lesão endometriótica, remanescendo dessa maneira, uma amostra experimental de 48 roedores.

### 4.1 RESULTADOS MORFOLÓGICOS E IMUNOISTOQUÍMICOS

Para a aplicação do teste estatístico em relação à análise das áreas dos implantes, os três grupos foram comparados nos tempos equivalentes ao primeiro procedimento (T0), segundo procedimento (T21), ou seja, visualização da área dos implantes e administração dos medicamentos e terceiro procedimento ou eutanásia (T60).

A Tabela 4 demonstra estatísticas descritivas de acordo com os grupos e os valores de p dos testes estatísticos, sendo os realçados em vermelho os resultados que obtiveram relevância estatística.

**Tabela 4.** Tamanho do implante endometriótico (mm<sup>2</sup>) nos três momentos de procedimentos cirúrgicos.

Variável	Grupo	n	Média	Desvio padrão	Valor de p*
Tamanho do Implante (T0)	Controle	18	24,2	2,6	
	Leuprolide	13	25	0	
	PRP	17	24,5	2,2	0,458
Tamanho do Implante no início do tratamento com a droga (T21)	Controle	18	32,2	17,6	
	Leuprolide	13	34,5	21,8	
	PRP	17	24,5	13,6	0,115
Tamanho do Implante na Eutanásia (T60)	Controle	18	25,4	15,5	
	Leuprolide	13	14,1	11,8	**
	PRP	17	15,5	8,3	0,021

\*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$

\*\*Os grupos pertencentes à variável T60 apresentaram significância estatística, sendo então comparados dois a dois:

Controle x Leuprolide  $p = 0,007$ ;

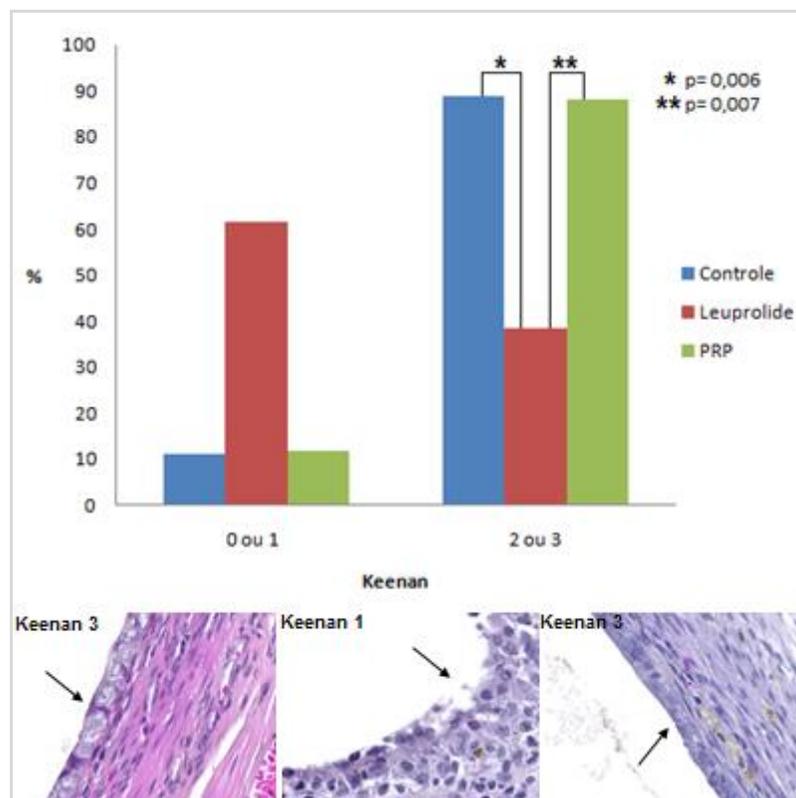
Controle x PRP  $p = 0,044$ ;

Leuprolide x PRP  $p = 0,374$

Em relação à avaliação histológica (classificação de Keenan) os graus 0 e 1 foram agrupados, dado que foi encontrado o escore 0 em apenas um cisto (grupo acetato de leuprolide). Os graus 2 e 3 também foram associados por se considerar que o epitélio se encontra preservado em ambas as classificações (Tabela 5). Na figura 18 estão apresentados o gráfico com os resultados obtidos, bem como as imagens pertencentes ao grupo controle (escore 3), leuprolide (escore 1) e grupo PRP (escore 3).

**Tabela 5.** Frequências e percentuais de animais de acordo com os grupos e as classificações de Keenan.

Keenan	Grupo		
	Controle	Leuprolide	PRP
0 ou 1	2 11,10%	8 61,50%	2 11,80%
2 ou 3	16 88,90%	5 38,50%	15 88,20%
Total	18	13	17



**Figura 18.** Análise histopatológica segundo a classificação de Keenan. O grupo leuprolide apresentou relevância estatística frente aos grupos controle e PRP por apresentar menor número de casos 2 ou 3. A primeira e a terceira imagem evidenciam o epitélio bem preservado (Keenan 3) dos grupos controle e PRP, respectivamente, enquanto a imagem central demonstra o epitélio mal preservado (Keenan 1) referente ao grupo leuprolide. Fonte: a autora, 2017.

Observa-se na Figura 18 que os grupos controle e PRP apresentaram maior número de casos com escores 2 e 3 que o grupo leuprolide, com relevância estatística (o nível de significância foi corrigido por Bonferroni,  $p < 0,017$ ).

Na Tabela 6 são apresentadas estatísticas descritivas dos marcadores inflamatórios (citocinas e células inflamatórias) estudados, bem como os valores de p obtidos quando os grupos são confrontados dois a dois. Os valores destacados em vermelho são aqueles cujo p apresentou significância estatística.

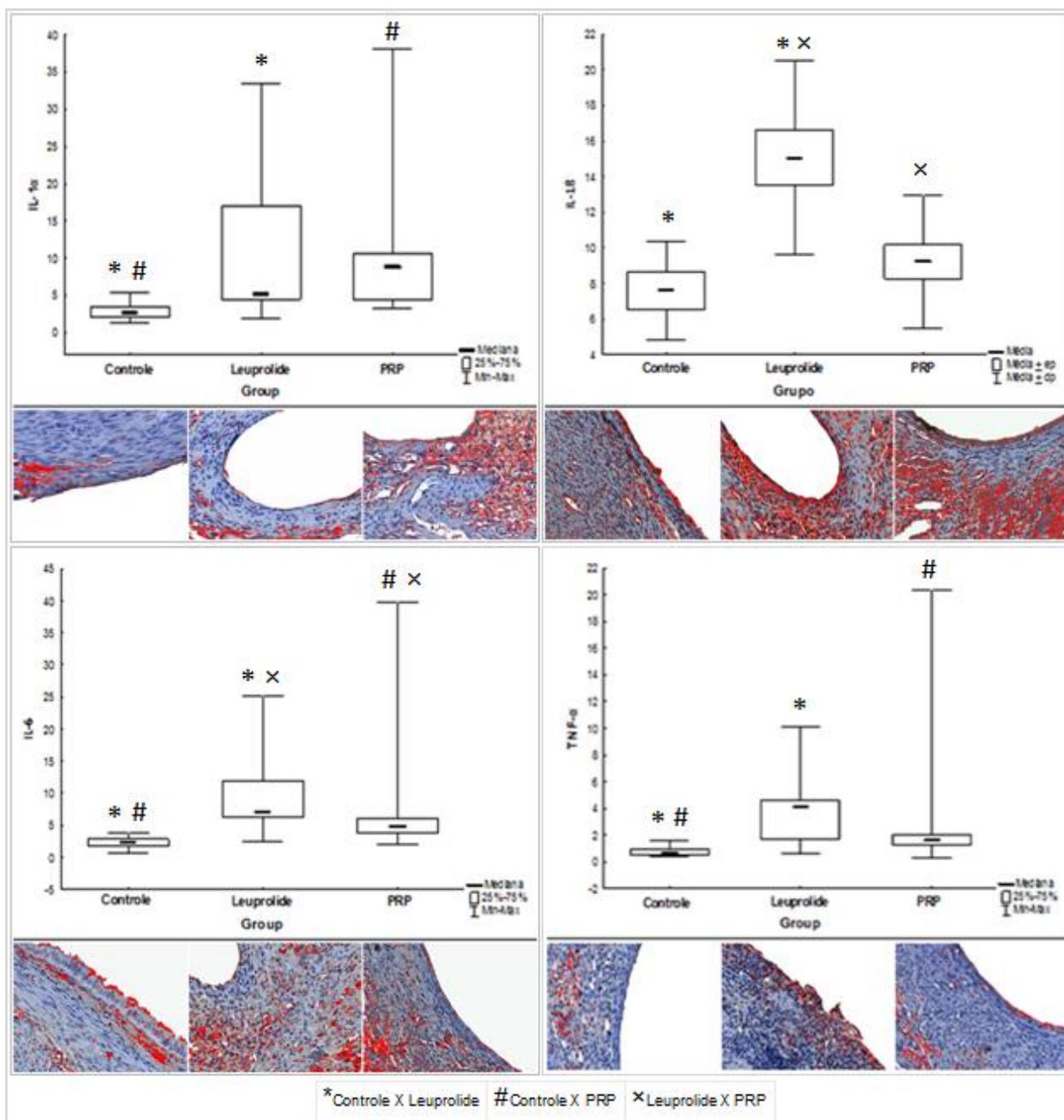
**Tabela 6.** Estatística descritiva dos marcadores inflamatórios (citocinas e células inflamatórias) e valores de p obtidos quando os grupos são confrontados dois a dois (C= controle; L=leuprolide; P = PRP).

Variável	Grupo	n	Média	Desvio padrão	Valor p* (C x L x P)	C x L	C x P	L x P
Expressão de IL- $\alpha$	Controle	18	3,01	1,2				
	Leuprolide	13	11,64	9,76				
	PRP	13	11,5	10,34	0,001	<0,001	<0,001	0,795
Expressão de IL- $\beta$	Controle	7	7,61	2,77				
	Leuprolide	12	15,07	5,47				
	PRP	16	9,22	3,75	0,001	0,001	0,414	0,001
Expressão de IL-6	Controle	12	2,33	0,85				
	Leuprolide	12	9,56	6,18				
	PRP	16	7,21	8,92	<0,001	<0,001	<0,001	0,034
Expressão de TNF- $\alpha$	Controle	16	0,78	0,37				
	Leuprolide	9	3,79	2,87				
	PRP	17	3,26	5,06	<0,001	<0,001	<0,001	0,084
Células CD68+	Controle	16	0,51	0,28				
	Leuprolide	13	1,1	0,84				
	PRP	16	0,84	0,68	0,049	0,016	0,145	0,271
Células CD56+	Controle	17	0,4	0,24				
	Leuprolide	13	1,93	0,68				
	PRP	16	1,59	0,68	<0,001	<0,001	<0,001	0,111
Células CD4+	Controle	17	0,71	0,2				
	Leuprolide	13	1,46	0,79				
	PRP	16	0,93	0,64	0,003	0,001	0,28	0,016
Células CDF+	Controle	17	0,58	0,18				
	Leuprolide	13	1,38	0,75				
	PRP	16	1,18	0,74	0,002	0,001	0,007	0,371

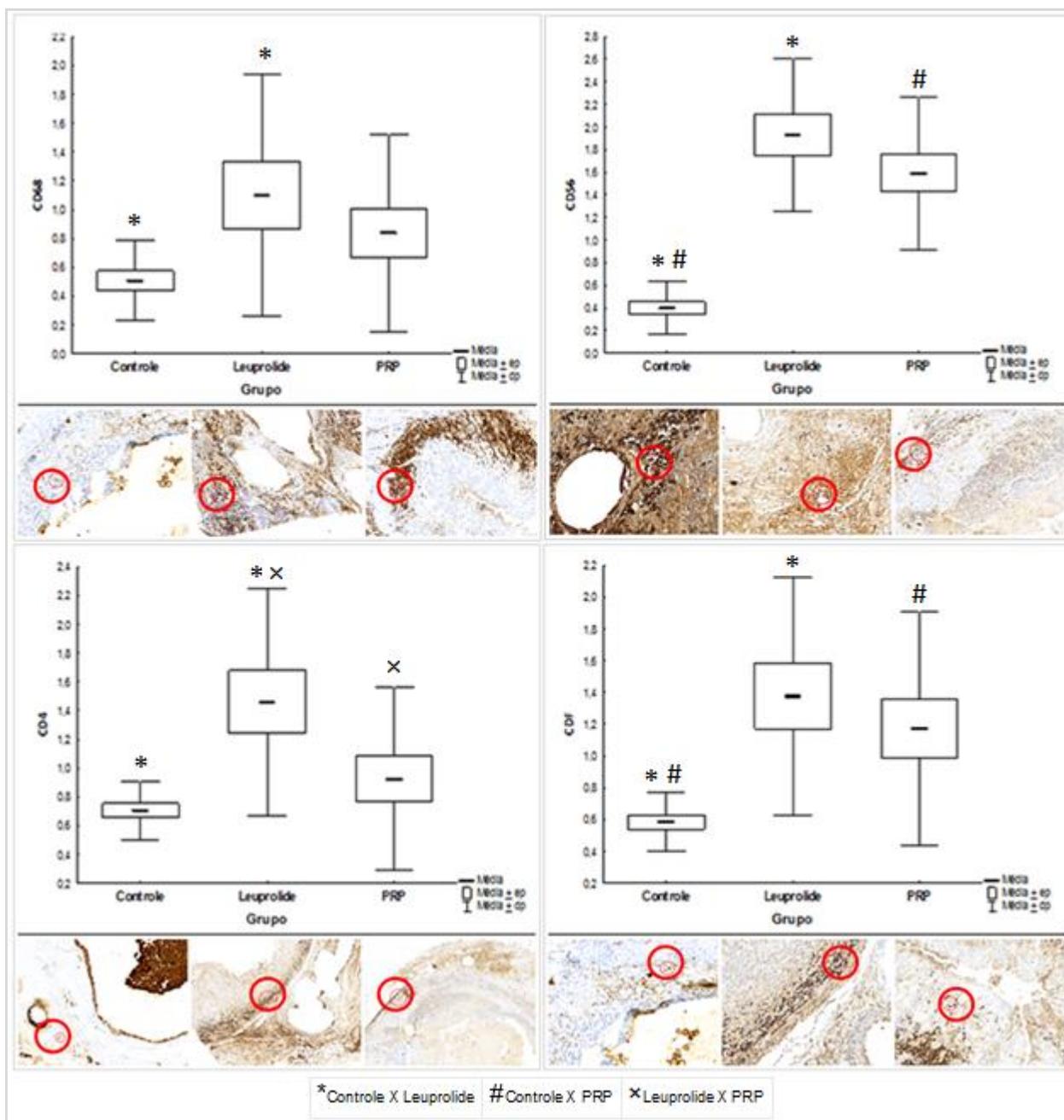
\*ANOVA com um fator (IL-1 $\beta$ , CD68+, CD56+, CD4+ e CDF+) ou teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (IL-1 $\alpha$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ), p<0,05.

Na Figura 19, as imagens dos cistos fragmentados estão coradas em vermelho, demonstrando imunopositividade em relação às citocinas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ). Estas imagens estão localizadas abaixo de seus respectivos grupos.

Os círculos vermelhos na Figura 20 representam a leitura realizada em um campo do cisto endometriótico (contagem do número de células inflamatórias CD68+, CD56+, CD4+ e CDF+). As imagens estão localizadas abaixo de seus respectivos grupos.



**Figura 19.** Análise estatística das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . Observa-se que houve significância estatística no grupo PRP versus controle das citocinas: IL-1 $\alpha$ :  $p < 0,001$ ; IL-6:  $p < 0,001$ ; TNF- $\alpha$ :  $p < 0,001$ , bem como se observa significância estatística em todos os marcadores inflamatórios do grupo leuprolide versus o controle. As imagens dos cistos estão coradas em vermelho, demonstrando a imunopositividade tecidual em relação às citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  respectivamente. Estas imagens estão localizadas abaixo de seus respectivos grupos nos gráficos. Fonte: a autora, 2017.



**Figura 20.** Análise estatística das células CD68+, CD56+, CD4+ e CDF+. Observa-se que houve significância estatística no grupo PRP versus o controle das células inflamatórias CD56:  $p < 0,001$  e CDF:  $p < 0,007$ , bem como se observa significância estatística em todas as células inflamatórias do grupo leuprolide versus o controle. Os círculos vermelhos representam a leitura realizada em um campo do cisto endometriótico com contagem do número de células inflamatórias CD68+, CD56+, CD4+ e CDF+ respectivamente. As imagens estão localizadas abaixo de seus respectivos grupos no gráfico. Fonte: a autora, 2017.

A Tabela 7 apresenta a avaliação da correlação entre o tamanho do implante (área - momento da eutanásia) e os marcadores inflamatórios. Estão evidenciados os coeficientes de correlação de Spearman estimados e os valores de p dos testes estatísticos. Optou-se por apresentar apenas os dados referentes ao PRP, pois foi o único grupo que evidenciou significância estatística.

**Tabela 7.** Correlação da área dos implantes no momento da eutanásia com os marcadores pró-inflamatórios do grupo referente ao PRP ( $p < 0,05$ ).

Variáveis	n	Coeficiente de correlação de Spearman	Valor de p
Área eutanásia x IL-1 $\alpha$	13	-0,36	0,232
Área eutanásia x IL-1 $\beta$	16	-0,59	<b>0,016</b>
Área eutanásia x IL-6	16	-0,39	0,138
Área eutanásia x TNF- $\alpha$	17	-0,2	0,446
Área eutanásia x CD68	16	-0,33	0,21
Área eutanásia x CD56	16	-0,12	0,657
Área eutanásia x CD4	16	-0,32	0,225
Área eutanásia x CDF	16	-0,49	0,057

Desde que tenha significância estatística, o grau de associação pode ser classificado em: Excelente:  $r > 0,90$ ; Bom:  $r$  de 0,75 a 0,90; Moderado:  $r$  de 0,50 a 0,74 e Fraco:  $r < 0,50$ .

No caso apresentado, observa-se que o grau de associação existente é o moderado no que se refere à variável área do implante confrontado à IL-1 $\beta$  (-0,59).

## 5 DISCUSSÃO

A endometriose é uma doença cuja etiopatogenia não está totalmente elucidada. A busca contínua pelo esclarecimento de sua patogênese é evidenciada pela quantidade de estudos publicados nos últimos 20 anos, uma vez que, ao entender como ocorre seu desenvolvimento, tanto o seu tratamento quanto o seu diagnóstico poderão ser otimizados<sup>69</sup>.

A terapêutica medicamentosa clássica dessa afecção tem por base a supressão hormonal ovariana, de forma a induzir um ambiente hipoestrogênico que proporcione a atrofia dos focos endometrióticos<sup>70</sup>. Sua utilização é efetiva na redução da intensidade de quadros relacionados à dor, porém, além de provocar efeitos indesejados como os que ocorrem com os análogos do GnRH, a recorrência dos sintomas é comum com a interrupção do tratamento<sup>30</sup>. Se por um lado busca-se repostas acerca da etiopatogenia da endometriose, por outro, busca-se um tratamento ideal para o controle ou até mesmo a cura dessa moléstia.

Pesquisas com modelos animais de pequeno porte, como os roedores, permitem a avaliação de novas abordagens terapêuticas, uma vez que é possível estabelecer lesões semelhantes às da endometriose por meio de técnica cirúrgica<sup>30</sup>.

Diversos autores sustentam a ideia de que o sistema imune esteja intimamente relacionado ao desenvolvimento da endometriose, posto o raciocínio que atualiza a teoria da menstruação retrógrada, no sentido de que as células do sistema imune deveriam eliminar, com a inflamação local, as células do endométrio extravasadas para o peritônio. Todavia, nas pacientes portadoras de endometriose, este mecanismo de defesa sofreria um viés permitindo a implantação e o desenvolvimento de fragmentos endometriais, dando origem focos endometrióticos<sup>71,72</sup>.

Indícios da literatura apontam que a quantidade de macrófagos peritoneais e a produção de citocinas pró-inflamatórias se encontram aumentados em pacientes com endometriose, porém sua atividade fagocítica se apresenta reduzida, o que colaboraria possivelmente para a implantação e invasão do tecido endometrial ectópico.<sup>18</sup> Evidenciou-se também que a quantidade de células NK estaria aumentada, contudo sua atividade citotóxica contra células endometriais parece estar diminuída<sup>19</sup>. Além

disso, as células dendríticas parecem não desempenhar seu papel de modo satisfatório como apresentadoras de antígenos aos linfócitos T, visto que as populações de dessas células maduras se apresentam com um decréscimo acentuado no endométrio de mulheres com endometriose e com um acréscimo significativo de células dendríticas imaturas.<sup>20</sup>

Numerosos investigadores têm mostrado que as concentrações de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  estão elevadas no fluido peritoneal de mulheres com endometriose, os quais contribuiriam na promoção e adesão de células endometriais em local ectópico, além de estimularem a angiogênese.<sup>16,23,24,26,27</sup>

A procura por drogas anti-inflamatórias (imunomoduladoras) que possuam efeitos contrários aos dos medicamentos anti-hormonais, além dos estudos consistentes da participação do sistema imune na endometriose, nos levaram, no presente projeto, à avaliação do PRP em um estudo experimental com ratas, dado os achados que este produto possui ação no processo de inflamação e reparo tecidual.

Conforme explicitado anteriormente, sugere-se que o PRP possua ação na modulação da inflamação, dado que se constatou que este produto seria capaz de inibir a cascata do NF- $\kappa$ B por aumentar a expressão do I $\kappa$ B $\alpha$  ou por silenciar a subunidade p65 do heterodímero do NF- $\kappa$ B. Ademais, os fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e o IGF-1 contribuiriam na ação anti-inflamatória por afetar as vias de sinalização da IL-1, em condrócitos humanos como observado no estudo de Bendinelli e colaboradores<sup>49</sup>. Em contrapartida, há evidências da ação pro-inflamatória de alguns componentes presentes no PRP. As proteínas plasmáticas ( $\alpha$ -2-macroglobulina,  $\alpha$ -1-macroglobulina e proteína de ligação da vitamina D) ativariam os macrófagos através do receptor Toll Like o que induziria à expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, estimulando, dessa maneira, a inflamação<sup>57</sup>.

A pesquisa em questão demonstrou que o tratamento com PRP foi efetivo em reduzir a área dos implantes endometriais em relação ao grupo Controle ( $p < 0,05$ ), no momento da eutanásia. Contudo, ao se avaliar a expressão dos marcadores inflamatórios observou-se que cinco dos oito marcadores apresentaram-se significativamente aumentados quando confrontados ao grupo controle (IL-1 $\alpha$ :  $p < 0,001$ ; IL-6:  $p < 0,001$ ; TNF- $\alpha$ :  $p < 0,001$ ; CD56:  $p < 0,001$  e CDF:  $p < 0,007$ ), sugerindo que o PRP

tenha agido de forma a promover a inflamação local. Sreeramkumar et al.<sup>73</sup> evidenciou que durante a resposta inflamatória foi constante a interação das plaquetas com os leucócitos ancorados na parede endotelial em processo de migração, por meio da interação da proteína expressa nas superfícies dos neutrófilos PSGL-1 com a P-selectina em plaquetas. Os leucócitos, quando recrutados em caso de inflamação local, perdem a morfologia simétrica e se tornam polarizados, com bordas providas de proteínas, como a PSGL-1. Sua interação com a P-selectina parece ser fundamental para o início do processo inflamatório.

O CD40 ligante (CD40-L), uma proteína transmembrana pertencente à superfamília do TNF- $\alpha$ , presente nos linfócitos B e T e células da imunidade inata, quando ligados ao CD40 (outra proteína de membrana encontrada nas células citadas anteriormente), desencadeia um papel fundamental na regulação da resposta imune<sup>74</sup>. O CD40-L presente nas plaquetas ativadas induzem as células endoteliais a secretar quimiocinas e a expressar moléculas de adesão para o recrutamento de células inflamatórias, induzindo aos efeitos inflamatórios<sup>50</sup>. Gonçalves et al.<sup>75</sup>, observou em seu trabalho com a infecção de *Leishmania major* em camundongos, que as plaquetas ativadas pelo sistema complemento, se agregam umas às outras e também ao parasita, liberam o fator de crescimento PDGF que ativa as células ao redor da lesão como fibroblastos, células endoteliais, fazendo com que estas liberem rapidamente a proteína MCP-1, atraindo dessa forma os monócitos para o local da inflamação.

Outro achado relevante em relação às plaquetas corresponde ao fato de que também sintetizam a IL-1 $\beta$ , um dos marcadores mais importantes de indução inflamatória e produzida principalmente por monócitos e neutrófilos<sup>76</sup>. No corrente projeto, constatou-se que o grupo PRP apresentou um grau moderado de associação negativo no que se refere à variável área do implante (T=60) versus a IL-1 $\beta$  (-0,59; p=0,016). Ou seja, esse achado corrobora com a literatura, além de sugerir que a redução da área do implante da endometriose no grupo PRP no momento da eutanásia (p=<0,044), provavelmente se deu devido ao auxílio da atividade de reparo tecidual proveniente das células inflamatórias, possivelmente recrutadas pelas plaquetas.

Assim como o PRP, o tratamento com o acetato de leuprolide reduziu a área de implante endometriótico (p = 0,007), tal como apresentou aumento significativo dos

marcadores inflamatórios (IL-1 $\alpha$ :  $p < 0,001$ ; IL-1 $\beta$ :  $p < 0,001$ ; IL-6:  $p < 0,001$ ; TNF- $\alpha$ :  $p < 0,001$ ; CD68:  $p < 0,016$ ; CD56:  $p < 0,001$ ; CD4:  $p < 0,001$  e CDF:  $p < 0,007$ ), quando confrontados ao grupo controle. Neste estudo, não foi observada uma correlação entre a variável área do implante versus os marcadores inflamatórios. A regressão dos implantes endometrióticos com o uso do leuprolide já foi previamente identificado nos estudos experimentais de Kondo et al.<sup>30</sup>; Oktem et al.<sup>77</sup> e Cenksoy et al.<sup>78</sup>. Khan e colaboradores<sup>79</sup> sugerem que o tratamento com GnRH reduziria significativamente a reação inflamatória e a resposta angiogênica em tecidos relacionados a doenças reprodutivas, como a endometriose, por meio da diminuição significativa da quantidade de infiltração de monócitos e da densidade de microvasos encontrados nos espécimes de biópsia de mulheres tratadas com GnRH quando comparadas as não tratadas. Em contrapartida, Sozen e colaboradores<sup>80</sup> demonstraram em seu trabalho, utilizando tecidos de mioma, o aumento da expressão da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) no miométrio de mulheres que receberam o tratamento com GnRH. Estudos acerca do efeito direto do GnRH em relação à diminuição do acúmulo tecidual de macrófagos e sua associação a proteínas quimiotáticas se faz necessário<sup>79</sup>.

No que diz respeito à avaliação histológica de Keenan, primeiramente deve-se levar em consideração que esta classificação foi desenvolvida com o propósito de validação de metodologia experimental e não para a interpretação de resultados. Esta análise semiquantitativa não se correlaciona com o tamanho (área) do implante, dado que pode ser observado um cisto com tamanho expressivo, mas com uma classificação de Keenan de escore baixo. São propostas distintas, o qual um avalia de modo macroscópico (área) e outro microscópico (Keenan). Apesar dessa classificação não ter sido originalmente descrita para se avaliar resultados, ela passou a ser utilizada dessa maneira por falta de uma metodologia microscópica mais adequada. Por fim, uma vez que não foi realizada essa avaliação na reabertura das ratas no T21 (segunda cirurgia), não há como afirmar qual o escore inicial (classificação de Keenan) deste estudo antes do tratamento. Sendo assim, o resultado deste estudo demonstrou menores escores de Keenan no grupo leuprolide, em relação ao grupo controle ( $p < 0,006$ ) e PRP ( $p < 0,007$ ), o qual poderia denotar maior efetividade do tratamento, devendo ser interpretado com cautela.

Para finalizar, o presente estudo apresentou quatro limitações. A primeira foi ter usado um grupo controle com solução salina e não com plasma pobre em plaquetas (PPP), obtido durante o processo de produção do PRP, o que seria ideal para se avaliar a atuação das citocinas presentes no plasma. A segunda limitação foi à utilização de PRP heterólogo. Embora haja trabalhos que utilizem o PRP heterólogo<sup>65</sup> há dúvidas se não existiu alguma intercorrência no que diz respeito ao processo inflamatório com relação há rejeição de elementos heterólogos pelo animal experimental, já que se observou uma expressão significativa dos marcadores inflamatórios desse grupo quando comparado ao controle. A terceira limitação se refere à ausência de análise da classificação de Keenan no momento T21 a fim de se determinar quantas ratas estavam com implantes 0 ou 1 e quantas estavam com implantes 2 ou 3 imediatamente antes do tratamento com PRP. Isto facilitaria o uso da classificação de Keenan na interpretação de resultados após a administração de medicamentos para tratamento da endometriose. A quarta limitação foi a não determinação do hipoestrogenismo causado pelo leuprolide através do exame de citologia vaginal hormonal das ratas deste estudo.

## 6 CONCLUSÕES

- Houve redução da área dos implantes endometriais com o tratamento com PRP e acetato de leuprolide;
- O escore de Keenan foi maior no grupo tratado com PRP;
- Foi identificada maior expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 no grupo tratado com PRP, assim como foi observada uma expressão significativa das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no grupo tratado com acetato de leuprolide;
- Foi identificada maior expressão dos biomarcadores CD56+ e CDF+ no grupo tratado com PRP, bem como se observou uma expressão significativa dos biomarcadores CD68+, CD4+, CDF+ e CD56+ no grupo tratado com acetato de leuprolide;
- Foi identificada uma correlação moderada negativa entre o biomarcador IL-1 $\beta$  e a área do implante no grupo PRP.

## 7 REFERÊNCIAS

1. Vercellini P, Crosignani P, Somigliana E, Vignani P, Frattaruolo MP. et al. Waiting for Godot: a commonsense approach to the medical treatment of endometriosis. *Human Reproduction* 2011; 26 (1): 3-13.
2. Adamson GD, Kennedy SH, Hummelshoj I. Creating solutions in endometriosis: global collaboration through the World Endometriosis Research Foundation. *J Endometriosis* 2010; 2: 3-6.
3. D' Amico Filho N, Myung LHJ, Caraça DB. Epidemiologia. In: Podgaec S. Coleção Frebrasgo - Endometriose. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014, p. 11-21.
4. Lewis S, Dirksen S, Heitkemper M, Bucher L.; CAMERA I. Tratado de enfermagem médico - cirúrgica - Avaliação e assistência dos problemas clínicos. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.
5. Hoffman BL, Schorge JO, Halvorson L M, Bradshaw KD, Cunningham FG. Ginecologia de Williams. 2. ed. Porto Alegre: Mc Graw Hill, Artmed, 2014.
6. Carneiro M. Reis F. Endometriose. In: Corleta H, Capp E. Ginecologia no consultório. Porto Alegre: Artmed, 2008.
7. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997; 67 (n 5): 817-21.
8. Jansen RP, Russell P. Nonpigmented endometriosis: clinical, laparoscopic, and pathologic definition. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155 (Level III): 154-159.
9. Soares IA, Baroni S. Etiopatogenia. In: Santos DB, Soares IA, Favero Filho LA, Fernandes MDB, Ritt NMM, Barcelos RP, et al. Uma abordagem integrada da endometriose. Bahia: Editora UFRB, 2012, p. 24-34.
10. Viganò P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18 (2): 177–200.
11. Meyer R. Uber den staude der frage der adenomyosites adenomyoma in allgemeinen und adenomyonetitis sarcomatosa. *Zentralbl Gynakol* 1919; 36: 745-59.
12. Vinatier D, Orazi G, Cosson M, Dufour P. Theories of endometriosis. *Eur J. Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 96 (1): 21-34.
13. Sampson JA. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am J Pathol* 1927; 3 (2): 93-100.

14. Bricou A, Batt RE, Chapron C. Peritoneal fluid flow influences anatomical distribution of endometriotic lesions: why Sampson seems to be right. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; 38 (2): 127-34.
15. Mihalyi A, Kyama CM, Simsa P, Debrock S, Mwenda JM, D`Hooghe T M. The role of immunological and inflammatory factors in the development of endometriosis: indications for treatment strategies. *Therapy* 2005; 2: 623-39.
16. Jank CC, Bellelis P, Rizzo LV. Aspectos específicos da etiopatogenia da endometriose: sistema imunológico. In: Podgaec S. *Coleção Frebasgo - Endometriose*. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014, p. 27-47.
17. Bellelis P, Podgaec S, Abrão M. Fatores ambientais e endometriose. *Rev Assoc Med Bras* 2011; 57 (4): 456-46.
18. Rosa e Silva JC, Fortunato GG, Meola J. Aspectos gerais da etiopatogenia da endometriose. In: Podgaec, S. *Coleção Frebasgo - Endometriose*. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
19. Thiruchelvam U, Wingfield M, O'Farrelly C. Natural killer cells: key players in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2015; 74: 291–301.
20. Schulke L, Berbic M, Manconi F, Tokushige N, Markham R, Fraser IS. Dendritic cell populations in the eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Human Reprod* 2009; 24 (7): 1695-703.6
21. Podgaec S, Abrao MS, Dias JA, Jr., Rizzo LV, de Oliveira RM, Baracat EC. Endometriosis: an inflammatory disease with a T2 immune response component. *Human Reproduction* 2007; 22 (5):1373-9.
22. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J. *Robins & Cotrans - Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
23. Caio MBO, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocina e dor. *Rev Bras Anestesiologia* 2011; 61(2):255-265.
24. Malutan AM, Drugan T, Costin N, Ciordea R, Bucuri C, Rada MP. Pro-inflammatory cytokines for evaluation of inflammatory status in endometriosis. *Central European Journal of Immunology* 2015;40 (1).
25. Moberg C, Bourlev V, Ilyasova N, Olovsson N. Endometrial expression of LIF and its receptor and peritoneal fluid levels of IL-1a and IL-6 in women with endometriosis are associated with the probability of pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* DOI 10.1007/s00404-015-3626-0, 2015.
26. Berkkanoglu M, Arici A. Immunology and Endometriosis. *AJRI* 2003; 50: 48–59.
27. Lu D, Song H, Shi G. Anti-TNF- $\alpha$  treatment for pelvic pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 3 2013; 28 (3): CD008088.

28. Hemming R, Falcone T. Disponível em: <<https://clinicalgate.com/endometriosis-5/>>. Acesso em 24 jun. 2017
29. Nogueira M. O sequestro de uma vida. 1 ed. São Paulo: Copyright, 2010.
30. Kondo W, Dal Lago EA, Noronha L, Olandoski M, Kotze PG, Amaral VF. Effect of anti-TNF-a on peritoneal endometrial implants of rats. Rev Col Bras Cir 2011; 38 (4): 266-273.
31. Neto JN, Coleho TM, Aguiar GC, Carvalho LR, Araújo AGP, Girão MJBC, Schor E. Experimental endometriosis reduction in rat treated with *Uncaria tomentosa* (cat's claw) extract. Eur J Obstet Gynecol. doi:10.1016/j.ejogrb.2010.10.002, 2010.
32. Sarajari S, Muse JrK, Fox M. Endometriose. In: Decherney AH, Nathan L, Laufer N, Roman AS. Current Diagnóstico e Tratamento. 11. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2014.
33. Franke HR, Van de Weijer PH, Pennings TM, Van Der Mooren MJ. Gonadotropin-releasing hormone agonist plus "add-back" hormone replacement therapy for treatment of endometriosis: a prospective, randomized, placebo-controlled, double-blind trial. Fertil Steril. 2000; 74 (3): 534-9.
34. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'hooghe T, Dunselman G, Greb R, Eshre Guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. Hum Reprod 2005; 20 (10): 2698-704.
35. Kondo W, Dal Lago EA, Francisco JC, Simeoni RB, De Noronha L, et al. Effect of the bone marrow derived-mononuclear stem cells transplantation in the growth, VEGF-R and TNF-alpha expression of endometrial implants in Wistar rats. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2011; 158 (2):298-304.
36. Oktem M, Ozcan P, Erdem O, Karakaya C, Cenksoy C, Guner H, et al. The effect of captopril on endometriotic implants in a rat model. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 2014; 180: 120-125.
37. Dmowski WP, Braun DP. Immunology of endometriosis. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2004; 18: 245-63.
38. Elnashar A. Emerging treatment of endometriosis. Middle East Fertility Society Journal 2015; 20, 61–69.
39. Keenan JA, Williams-Boyce PK, Massey PJ, Chen TT, Caudle MR, Bukovsky A. Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with the immune modulators loxoribine and levamisole. Fertil Steril, 1999; 72(1): 135-41.

40. Koninckx PR, Craessaerts M, Timmerman D, Cornillie F, Kennedy S. Anti-TNF-alpha treatment for deep endometriosis-associated pain: a randomized placebo-controlled trial. *Hum Reprod* 2008; 23(9):2017-23.
41. Amable PR, Carias RBV, Teixeira MVT, Pacheco IC, Amaral RJFC, Granjeiros JG. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Research & Therapy* 2013; 4: 67.
42. Vendramin FS, Franco D, Nogueira CM, Pereira MS Platelet-Rich Plasma And Growth Factors: Processing Technique And Application In Plastic Surgery. *Rev Col Bras Cir* 2006; 33 (1): 24-28.
43. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* v.60, p. 1176-1181, 2002.
44. Wasterlain AS, Braun HJ, Harris AH, Kim HJ, Dragoo JL. The systemic effects of platelet-rich plasma injection. *Am J Sports Med* 2002; 4:186-93.
45. Zadehmodarres S, Salehpour S, Saharkhiz N, Nazari L. Treatment of thin endometrium with autologous platelet-rich plasma: a pilot study. *JBRA Assisted Reproduction* 2017; 21(1):54-56
46. Italiano JE, Hartwig JH. Megakaryocyte development and platelet formation. In: Michelson AD. *Platelets*. California: Academic Press, 2002.
47. Everts PA, Knape J T, Weibrich G, Schönberger JP, Hoffmann J, Overdevest EP, et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *JECT* 2006; 38: 174–87.
48. Pelletier MH, Malhotra A, Brighton T, Walsh WR, Lindeman R. Platelet function and constituents of platelet rich plasma. *Int J Sports Med* 2013; 34 (1): 74-80.
49. Bendinelli P, Matteucci E, Dogliotti G, Corsi MM, Banfi G, Maroni P, et al. Molecular basis of antiinflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF- $\kappa$ B inhibition via HGF. *J Cell Physiol* 2010; 225 (3): 757–766.
50. Andia I, Maffulli N. Platelet-rich plasma for managing pain and inflammation in osteoarthritis. 2013; 9(12): 721-30.
51. Barnes PJ, Adcock IM. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14 (12): 436-41.
52. Baeuerle PA, Baltimore D. NF- $\kappa$ B: Ten years after. *Cell* 1996; 87 (1): 13-20.
53. Malek R, Borowicz KK, Jargiello M, Czuczwar SJ Role of nuclear factor  $\kappa$ B in the central nervous system. *Pharmacological Reports* 2007; 59 (1): 25-33.

54. Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ, Dragoo JL. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet rich plasma separation systems. *Am J SportsMed* 2011; 39 (2): 266-71.
55. Van Miert AS. Present concept son the inflammatory modulators with special reference to cytokines. *Vet Res Common* 2002; 26: 111-126.
56. Montaseri A, Busch F, Mobasher a, Burhmann C, Aldinger C, Rad JS, Shakibaei M. IGF-1 and PDGF-bb suppressIL-1 $\beta$ -induced cartilage degradation throughdown-regulation of NF- $\kappa$ B signaling: involvement of Src/PI-3K/AKT pathway. *PLoS ONE* 2011; 6 (12): 28663e.
57. Thomas Mr, Storey Rf. The role platelets in inflammation. *Thromb Haemost* 2015; 3 (114): 449-458.
58. Oliveira I, Girão MJBC, Sampaio MU, Oliva MLV, Andrade SS Platelets: Traditional and nontraditional roles in hemostasis, inflammation and cancer. *ABCS Health Sci* 2013; 38 (3): 153-161.
59. Semple JW, Italiano JE, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(4): 264-74.
60. Schor E, Freitas V, Soares JrJM Simões MJ, Baracat ED. Endometriose: modelo experimental em ratas. *Rev Bras Ginecol Obstet* 1999; 21(5): 281-4.
61. Hirata T, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Harada M, Takemura Y, et al. Development of an experimental model of endometriosis using mice that ubiquitously express green fluorescent protein. *Hum Reprod* 2005; 20 (8): 2092-6.
62. Jones RC. The effect of a luteinizing hormone releasing hormone(LRH) agonist (Wy-40,972), levonorgestrel, danazol and ovariectomyon experimental endometriosis in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1984; 106 (2):282-8.
63. Amaral VF, Dal Lago EA, Kondo W, Guarita LC, César F. Development of an experimental model of endometriosis in rats. *Rev Col Bras Cir* 2009; 36 (3): 250-255.
64. Dogan E, Saygili U, Posaci C, Tuna B, Caliskan S, Altunyurt S, et al. Regression of endometrial explants in rats treated with the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib. *Fertil Steril* 2004, 82 (3): 1115-20.
65. Atalay Y, Bozkurt MF, Gonul Y, Cakmak O, Agacayak KS, Köse I. The effects of amlodipine and platelet rich plasma on bone healing in rats. *Drug Design, Development and Therapy* 2015; 9: 1973–1981.
66. Vendramin FS, Franco D, Franco TR. Métodos de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. *Rev Bras Cir Plást* 2009; 24 (2): 212-8.

67. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärnlund M, Schraml P, Leighton S. Tissue microarrays for high-throughput molecularprofiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4 (7): 844-7.
68. Vizzotto JrAO, Noronha L, Scheffel DLH, Campos ACL. Effect of the cisplatin applied before and after the surgical procedure on the healing of colonic anastomoses in rats. *J. Bras. Patol Med Lab* 2003; 39 (2): 143-149.
69. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004; 364: 1789-99.
70. Petta CA, Ferriani R A, Abrao MS, Hassan D, Rosa E Silva JC, Podgaec S. Randomized clinical trial of a levonorgestrel-releasing intrauterine system and a depot GnRH analogue for the treatment of chronic pelvic pain in women with endometriosis. *Hum Reprod* 2005; 20 (7): 1993-8.
71. Berkkanoglu M, Arici A. Immunology and endometriosis. *Am J Reprod. Immunol* 2003; 50: 48-59
72. Harada T, Iwabe T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 76 (1): 1-10.
73. Sreeramkumar V, Adrover JM, Ballesteros I, Cuartero MI, Rossaint J, Bilbao I. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* 2014; 346 (6214): 1234-38.
74. Van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000; 67 (1): 2-17.
75. Goncalves R, Zhang X, Cohen H, Debrabant A, Mosser DM. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *J Exp Med* 2011; 208 (6): 1253-65.
76. Oliveira I, Girão MJBC, Sampaio MU, Oliva MLV, Andrade S S. Platelets: Traditional and nontraditional roles in hemostasis, inflammation and cancer. *ABCS Health Sci* 2013; 38 (3): 153-161.
77. Oktem M, Ozcan P, Erdem O, Karakaya C, Cenksoy C, Guner H. The effect of captopril on endometriotic implants in a rat model. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2014; 180: 120-125.
78. Cenksoy PO, Oktem M, Erdem O, Karakaya C, Cenksoy C, Erdem A, et al. A potential novel treatment strategy: inhibition of angiogenesis and inflammation by resveratrol for regression of endometriosis in an experimental rat model. *Gynecol Endocrinol* 2015; 31(3): 219-24.
79. Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H. Changes in tissue inflammation, angiogenesis and apoptosis in endometriosis, adenomyosis and uterine myoma after GnRH agonist therapy, *Human Reproduction* 2010; 25 (3): 642–653.

80. Sozen I, Senturk I M, Arici A. Effect of gonadotropin-releasing hormone agonists on monocyte chemotactic protein-1 production and macrophage infiltration in leiomyomatous uterus. *Fertil Steril* 2001; 76 (4): 792–796.

# ANEXO A - PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Ética em Pesquisa

Curitiba, 11 de Fevereiro de 2015.

## PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

**REGISTRO DO PROJETO:** 0784 – EMENDA (Alteração de pesquisador)

**TÍTULO DO PROJETO:** Comparação do plasma rico em plaquetas, células tronco mononucleares e análogos do GNRH no tratamento de endometriose profunda.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Vivian Ferreira do Amaral

**EQUIPE DE PESQUISA:** Vivian Ferreira do Amaral, Caroline Busatta Vaz de Paula

**INSTITUIÇÃO:**

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**ESCOLA / CURSO:**

Escola de Medicina / Medicina

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
<i>Rattus norvegicus</i>	F	03 meses / 200 – 250g	C	80 (Liberados em 19.09.2013)

O colegiado do CEUA em reunião no dia **19.09.2013**, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer:  
**APROVADO.**

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Marta Luciane Fischer  
Coordenadora - Comitê de Ética no Uso de Animais.

